

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'un système de transfection de cellules endothéliales et épithéliales humaines, pour étudier les effets de l'acide lysophosphatidique (LPA)

Bette, Laurie

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Mise au point d'un système de transfection de cellules endothéliales et
épithéliales humaines, pour étudier les effets de l'acide lysophosphatidique
(LPA)**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Laurie Bette

Juin 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Mise au point d'un système de transfection de cellules endothéliales et épithéliales humaines, pour étudier les effets de l'acide lysophosphatidique (LPA)

Laurie Bette

Résumé

Le LPA est un lipide bioactif, produit entre autres par les plaquettes activées et au cours de l'oxydation des LDL. Cette molécule exerce de nombreux effets sur les cellules de la paroi vasculaire via des récepteurs couplés à des protéines G, les récepteurs LPA et on lui attribue un rôle tantôt pro-athérogène, tantôt anti-athérogène. Récemment, McIntyre et ses collaborateurs (2003) ont aussi montré que le LPA était un ligand à haute affinité du récepteur nucléaire PPAR γ , ce dernier ayant des effets globalement plutôt anti-athérogènes.

Ce mémoire avait un double objectif. Primo, caractériser un modèle de cellules endothéliales humaines en culture, les cellules EAhy926, en vérifiant l'expression des récepteurs membranaires au LPA et du récepteur nucléaire PPAR γ . Secundo, nous avons essayé de mettre au point un protocole de transfections de ces cellules, dans le but de pouvoir étudier les voies de signalisation liées au LPA via des plasmides rapporteurs inductibles, et en particulier les plasmides pAP1-Luc et pPPRE-Luc, respectivement régulés par AP-1 et PPAR γ activés. Pour activer PPAR γ , nous utiliserons la rosiglitazone et le LPA.

Nos résultats s'étant révélés décevants au niveau des transfections, nous avons décidé de continuer notre étude avec un autre type de modèle cellulaire, les cellules épithéliales HeLa. Dans ce modèle, nous avons pu démontrer que le LPA est bien un ligand de PPAR γ .

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur: Prof. M. Raes

Arrivée au terme de mes études, je tiens à remercier de nombreuses personnes qui m'ont soutenue au cours de ce travail ou qui m'auront tout simplement fait passer de bons moments.

Merci au professeur J. Remacle de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Un très grand merci à Martine Raes de m'avoir permis d'intégrer son équipe, de m'avoir appris à avoir plus de rigueur, à gérer mes « petits défauts ». Merci aussi pour toutes les corrections apportées à ce mémoire pour y avoir consacré votre temps. Votre enthousiasme m'aura permis d'avancer lors des périodes plus difficiles.

J'aimerais ensuite remercier (honneur aux dames) Aurélie Tacheny, pour toute l'aide apportée et particulièrement ces dernières semaines. Je ne me voyais pas venir au bout de cette rédaction si tu ne m'avais pas aidée. Je te souhaite un peu à l'avance tous mes vœux de bonheurs !

Merci beaucoup à Sébastien Toffoli ! Merci pour tes corrections, ton soutien moral, tes conseils, pour les articles envoyés, pour ta gentillesse à toutes épreuves, ... Je ne peux que te souhaiter de réussir les projets à venir.

Merci aussi à Cindy Gustin, pour m'avoir aidée cette journée stressante du 16 juin mais aussi d'avoir été disponible ces derniers mois quand je le désirais. Je voudrais aussi te souhaiter de réussir tes projets à venir.

Merci aussi à Martine M. de m'avoir épaulée pendant les manip, de m'avoir aidé à régler mes problèmes de dilutions.

Merci à Edouard pour son aide lors des WB, le « maître du 5^{ème} »

Arrive enfin le tour des mémorants, je ne les citerai pas tous mais je regrette de ne pas avoir appris à réellement connaître plus tôt Jérôme, Audrey, Sophie, Florence, Nancy,

Merci à toi Nancy pour tout le soutien moral que tu m'as apporté et pas seulement dans le cadre du mémoire, je suis vraiment contente d'avoir travaillé avec toi.

Merci à Sven pour son soutien moral, pour avoir résolu mes problèmes informatiques, pour les repas préparés, pour m'avoir fait rire quand il le fallait.

Enfin, je tiens à remercier mes parents pour tous les sacrifices fait pour permettre à mon frère et à moi de faire des études, pour avoir été à l'écoute pendant toutes ses années d'études..

Liste d'abréviations

μM:	micromolaire
Abs:	absorbance
AC:	adénylate cyclase
ADN:	acid désoxyribonucléique
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
APS:	ammonium persulfate
ATCC:	american type culture collection
ATP:	adenosine triphosphate
βgal:	β-galactosidase
BSA:	bovine serum albumin
CBNF:	carboxynaphthofluorescein diacetate
CMV:	cytomegalovirus
CREB:	cAMP response element-binding protein
CTE:	C-terminal extension
DAG:	diacylglycérol
DBD:	DNA binding domain
DHA:	docosaénoïque
DMSO:	diméthylsulfoxyde
DOPE:	dioléyl-oxy-phosphatidyléthanolamine
DOTMA:	dioléyl-oxy-propyl-triméthylammonium
DR-1:	direct repeat-1
DTT:	dithiothréitol
ECL:	enhanced chemiluminescence
EDG:	endothelial differentiation gene
EDTA:	éthylène diamine tétra acétate
EGF:	endothelium growth factor
EGFP:	enhanced green fluorescent protein
ERK:	extracellular regulated kinase
ET-1:	endothéline-1
FATP:	fatty acid transporter protein
FBS:	fetal bovine serum
GDP:	guanosine diphosphate
GEF:	guanosine exchange factor
GPCRs:	G protein coupled receptors
GTP:	guanosine triphosphate
HBSS:	Hank's balanced salt solution
HDL:	high density lipoprotein
HETE:	acide 8-5-hydroxyeicosatétraénoïque
HEPES:	acid n-2-hydroxyéthyl-1-piperazin-N'-2-éthanosulfonic
HODE:	acide hydroxyoctadécadiénoïque
HRP:	horse radish peroxydase
HUVEC:	human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule-1
IgG:	immunoglobuline G
IKK:	inhibitor kinase kinase
IL-1:	interleukine-1
IP3:	inositol-3-phosphate

JNK:	cJun NH ₂ -terminal kinase
LA:	acide linoléique
LBD:	ligand binding domain
LCAT:	lecithine cholesterol acyl transférase
LDL:	low density lipoprotein
LPA:	acide lysophosphatidique
LPC:	lysophosphatidycholine
LPE:	lysophosphatidyléthanolamine
LPL:	lipoprotéine lipase
LPLD:	lysophospholipase D
LPP:	lipide phosphate phosphatase
LPS:	lysophosphatidylsérine
LTB ₄ :	leukotriène B ₄
MAG:	monoacylglycérol
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MCP-1:	monocyte chemotactic protein-1
MEK:	MAP kinase extracellular kinase
MLC:	myosin light chain
mm:	millimetre
mm-LDL:	minimally modified low density protein
MTT:	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl) 2-5-diphényltétrazolium
NC-IUPHAR:	the international union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification
NFκB:	nuclear factor Kappa binding
nM:	nanomolaire
NSAID:	non stéroïdien anti-inflammatoire drugs
ONPG:	2-O-nitrophényl-β-D-galactopyranoside
ox-LDL:	oxydized low density lipoprotein
PA:	acide phosphatidique
PAF:	platelet activating factor
PBS:	phosphate buffer saline
PC:	phosphatidylcholine
PDK:	phosphoinositides-dependant kinase
pdtIns(3,4,5)P ₅ :	phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PGJ ₂ :	prostaglandines J ₂
PI3K:	phosphatidyl-inositol-3-kinase
PIB:	protease inhibitor buffer
PIC:	protease inhibitor cocktail
PKB:	protéine kinase B
PKC:	protéine kinase C
PLA ₂ :	phospholipase A ₂
PLB:	passive lysis buffer
PLC:	phospholipase C
PLD:	phospholipase D
PMA:	phorbol myristate acetate
PPARs:	peroxysome proliferators-activated receptors
PPRE:	PPAR response element
PVDF:	polyvinylidène fluoride
RLU:	relative light unit

RPM:	rotation par minute
SIP:	sphingosine-1-phosphate
SB 3-10:	sulfobétaïne 3-10
SDS:	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE:	sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SF:	superfect
SMTR:	silencing mediator for retinoid and thyroid receptor
sPLA2-IIA:	secretory phospholipase A ₂ IIA
SRC-1:	steroid receptor coactivator
TBS:	tris buffer saline
TEMED:	tetramethylethylène diamine
TNF α :	tumor necrosis factor α
TZD:	thiazolidinédione
VCAM-1:	vascular cell adhesion molecule
VEGF:	vascular endothelial growth factor
X-gal:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

I INTRODUCTION.....	
I.1 L'ATHÉROSCLÉROSE	1
I.1.1 STRUCTURE DE L'ARTÈRE.....	1
I.1.1.1 L'intima	1
I.1.1.2 La média.....	1
I.1.1.3 L'adventice	1
I.1.2 LES LÉSIONS DE L'ATHÉROSCLÉROSE.....	2
I.1.2.1 La strie lipidique.....	2
I.1.2.2 La plaque fibreuse	2
I.1.2.3 La plaque d'athérome	2
I.1.3 LES MODÈLES HYPOTHÉTIQUES	3
I.2 L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE (LPA).....	4
I.2.1 STRUCTURE DU LPA	4
I.2.2 LES SOURCES DE LPA	5
Au niveau intracellulaire	5
Au niveau du sérum.....	5
Au niveau des autres cellules	6
Au niveau des LDL	6
I.2.3 LES EFFETS DU LPA	6
I.3. LES RÉCEPTEURS AU LPA	7
I.3.1 LES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES	7
I.3.1.1 Structure des récepteurs au LPA.....	7
I.3.1.2 Localisation tissulaire des récepteurs au LPA.....	8
I.3.1.3 Structure et mécanisme d'activation des protéines G	8
I.3.1.4 Voies de signalisation activées par le LPA.....	9
L'adénylate cyclase (AC)	9
La phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K)	9
La petite protéine G Ras et la voie des MAPK	9
La petite protéine G Rho	10
La phospholipase C	10
I.3.2 LES RÉCEPTEURS PPAR (PEROXYSONE PROLIFÉRATEUR-ACTIVÉS RECEPTORS)	10
I.3.2.1 Les PPARs et leurs ligands	10
I.3.2.2 PPAR γ et LPA	12
I.3.2.3 Principales fonctions de PPAR γ	13
PPAR γ dans l'adipogénèse	13
PPAR γ dans la pathologie du diabète.....	13
PPAR γ et la régulation du cycle cellulaire	14
PPAR γ dans la pathologie de l'athérosclérose et l'inflammation.....	14
II MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	
II.1 CULTURE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES EAHY926 ET ÉPITHÉLIALES HELA	16
II.1.1 MATÉRIELS	16
II.1.2 MÉTHODES	16
II.1.2.1 Repiquage	16
II.1.2.2 Comptage des cellules.....	17
II.1.2.3 Stimulation des cellules.....	17
II.2 GESTION DES PLASMIDES.....	17
II.2.1 DESCRIPTION DES PLASMIDES UTILISÉS	17
II.2.1.1 pCMV β (Clontech, USA).....	17
II.2.1.2 pEGFP- N1 (Clontech, USA).....	17
II.2.1.3 PathDetect signal transduction pathway cis-Reporting System (Stratagene, USA)	17
II.2.1.4 pRL-SV40 (Promega, USA)	18
II.2.1.5 pCMV-Myc (Clontech, USA)	18
II.2.2 PRODUCTION DES PLASMIDES.....	18
II.2.2.1 Matériels	18

II.2.2.2 Méthode	18
A. Amplification des plasmides.....	18
B. Quantification de l'ADN.....	19
C. Restriction enzymatique	19
II.3 TRANSFECTION DES CELLULES EAHY926 ET MODES DE RÉVÉLATION.....	20
II.3.1 TRANSFECTION UTILISANT LE SUPERFECT	20
II.3.1.1 Matériels	20
II.3.1.2 Méthode	20
II.3.2 TRANSFECTION UTILISANT LA LIPOFECTINE.....	20
II.3.2.1 Matériels	21
II.3.2.2 Méthodes.....	21
II.3.2 MODES DE RÉVÉLATION	21
II.3.2.1 Révélation de l'activité β -galactosidase	21
A. Révélation colorimétrique:.....	21
B. Révélation histochimique	22
II.3.2.2 Détermination de l'activité EGFP	22
A. Matériels	22
B. Méthode.....	23
II.3.2.3 Révélation de l'activité dual-luciférase	23
A. Matériels	23
B. Méthode	23
II.4 EVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ.....	24
II.4.1 DOSAGE PROTÉIQUE PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD.....	24
II.4.1.1. Matériels	24
II.4.1.2 Méthode	24
II.4.2 MESURE DE L'INCORPORATION CELLULAIRE ET DE LA RÉDUCTION DU MTT	24
II.4.2.1 Matériels.....	24
II.4.2.2 Méthodes.....	25
II.5 WESTERN BLOTTING À PARTIR D'EXTRAIT TOTAUX.....	25
II.5.1 MATÉRIELS	25
II.5.2 MÉTHODE.....	26
II.5.2.1 Préparation des lysats totaux et dosage protéique	26
II.5.2.2 Préparation des échantillons et migration.....	26
II.5.2.3 Transfert sur membrane.....	26
II.5.2.4 Révélation de la membrane avec des anticorps	26
II.5.2.5 Contrôle de charge.....	27
III RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	
III.1 LES CELLULES ENDOTHÉLIALES EAHY926.....	28
III.1.1 PRÉSENTATION DU MODÈLE CELLULAIRE EAHY926.....	28
III.1.2 Expression des récepteurs membranaires au LPA.....	29
III.1.3 Expression de PPAR _α	31
III.1.4 MISE AU POINT DES CONDITIONS DE TRANSFECTION.....	31
III.1.4.1 Essais préliminaires de transfection simple avec le plasmide pCMV- β	32
III.1.4.2 Essai de transfection triple	33
Triple transfections avec la GFP comme système rapporteur	33
Triple transfection avec le système des luciférases "Firefly"/ "Renilla"	34
III.1.4.3 Essais de doubles transfections avec le système des luciférases "firefly"/"Renilla".....	35
III.1.4.4 Essais de transfection avec le plasmide pPPRE-Luc	36
III.2 LES CELLULES ÉPITHÉLIALES HELA.....	36
III.2.1 PRÉSENTATION DU MODÈLE CELLULAIRE HELA.....	36
III.2.2 EXPRESSION DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES AU LPA.....	37
III.2.3 EXPRESSION DE PPAR _γ	37
III.2.4 MISES AU POINT DES CONDITIONS DE TRANSFECTION	37
III.2.4.1 Essais de transfection simple.....	38
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	

LES CELLULES ENDOTHÉLIALES EAHY926	39
<i>Expression des récepteurs membranaires au LPA</i>	39
<i>Expression du récepteur nucléaire PPARγ</i>	40
<i>Mises au point des conditions de transfection</i>	40
Essais de transfection simple avec le plasmide pCMV- β	40
Essais de transfections triples avec la GFP comme système rapporteur.....	41
Essais de transfections triples avec la luciférase comme système rapporteur.....	41
Essais de transfections double avec la luciférase comme système rapporteur	41
LES CELLULES ÉPITHÉLIALES HELA.....	42
<i>Expression des récepteurs membranaires au LPA</i>	42
<i>Expression du récepteur nucléaire PPARγ</i>	42
<i>Mises au point des conditions de transfection</i>	42
Essais de transfection simple avec la luciférase comme système rapporteur	42
Essais de transfections doubles avec les luciférase comme systèmes rapporteurs	42

V. BIBLIOGRAPHIE.....

I. Introduction

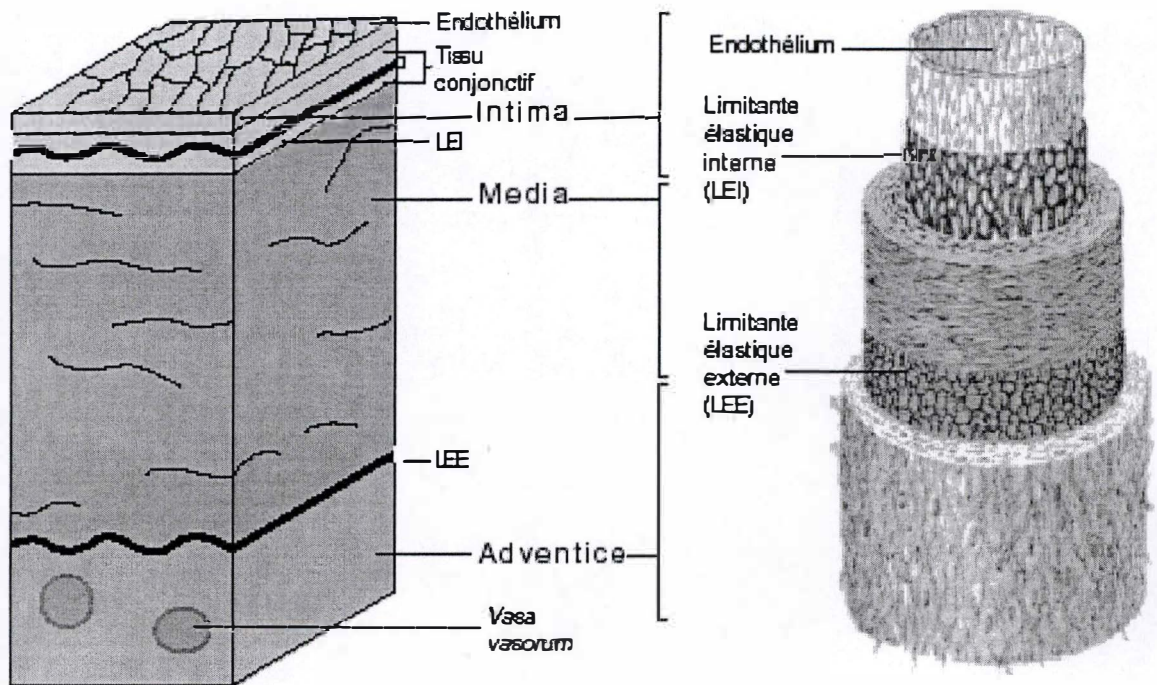


Figure I.1 : Schéma représentant les différentes couches qui composent l'artère élastique : l'intima, la média et l'adventice (<http://www.jleoni.free.fr/contenu/T-p1.html>).

I.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose ou athéromatose est la première cause de décès dans les pays occidentaux et apparaît en nette progression dans les pays en voie de développement. En effet, vu l'attrait pour le mode de vie occidentale, la proportion d'individus affectés dans les prochaines années risque d'augmenter étant donné les facteurs à risque associés (sédentarité, alimentation trop riche,...). L'athérosclérose fait partie d'un ensemble de maladies regroupées sous le nom d'athérosclérose. Toutes ont en commun un épaississement des parois artérielles accompagné d'une perte d'élasticité.

Elle se distingue par l'accumulation de dépôts lipidiques dans l'intima des parois artérielles. Les artères les plus touchées sont celles qui possèdent un diamètre supérieur à 2 mm et qui sont soumises à de fortes pressions c'est-à-dire l'aorte, les artères coronaires, les carotides, les mésentériques, les iliaques, les fémorales, les cérébrales issues du tronc basilaire et les carotides internes (Stevens et Lowe, 1997). Il est également reconnu que les lésions apparaissent préférentiellement aux endroits où le flux laminaire lié à la circulation du sang est perturbé (point de bifurcation,...).

Cette maladie débute dès l'enfance, mais ne se manifeste d'un point de vue clinique que bien plus tard. Elle est donc lente et progressive pouvant apparaître pratiquement chez tous les adultes, à différents stades.

Bien que les progrès dans la compréhension des étapes majeures de la pathologie aient été considérables, la pathogenèse et les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de l'athérosclérose, sont loin d'être complètement élucidés. Avant de décrire les lésions typiques de l'athérosclérose, nous rappellerons rapidement la structure normale des artères.

I.1.1 Structure de l'artère

I.1.1.1 L'intima

L'intima est la couche la plus interne des artères. Elle se compose d'une monocouche de cellules aplaties appelées cellules endothéliales et repose sur une lame basale sous laquelle se trouve la subendothéliale comprenant des fibres élastiques, une mince couche de fibres de collagènes et quelques cellules (fibroblastes et cellules musculaires lisses) (**figure I.1**)

I.1.1.2 La média

La média est la couche moyenne des artères. Elle est constituée de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques. C'est à ce niveau que l'on peut différencier une artère musculaire d'une artère élastique, la première étant composée presque entièrement de muscles au niveau de la média. L'artère élastique quant à elle possède de nombreuses lames élastiques concentriques réparties sur toute l'épaisseur de la média (**figure I.1**)

I.1.1.3 L'adventice

L'adventice est la couche la plus externe de la paroi des artères. Elle est composée de collagène et est irriguée par de petits vaisseaux sanguins nommés "vasa vasorum" qui se ramifient à travers la média (**figure I.1**)

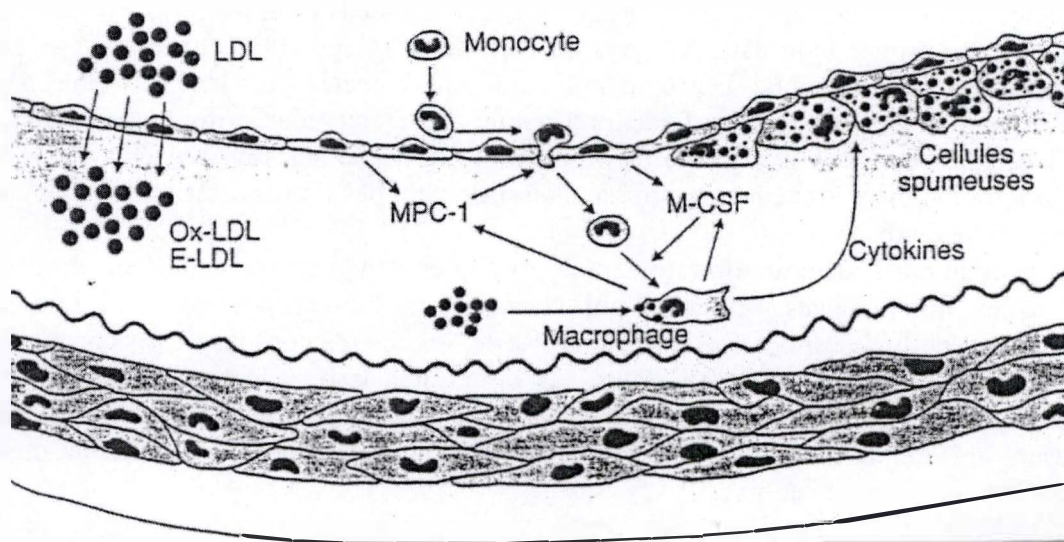


Figure I.2 : Schéma illustrant les différents types cellulaires concourant à la formation et la progression de l'athérosclérose (Tedgui et Mallat, 2001).

I.1.2 Les lésions de l'athérosclérose

L'athérosclérose se caractérise par des lésions qui passent à travers différents stades évolutifs : la strie lipidique, la plaque fibreuse et la plaque d'athérome (Ross, 1993).

I.1.2.1 La strie lipidique

La strie lipidique est présente dès l'enfance et consiste en une surélévation jaunâtre d'au moins 1 mm de diamètre de l'intima. Elle se compose de macrophages, de lymphocytes T, infiltrés suite à un dysfonctionnement de la perméabilité vasculaire. Ceci permet également l'entrée et donc l'accumulation de lipoprotéines de basse densité (LDL), celles-ci s'oxydent par des mécanismes enzymatiques ou non enzymatiques, dans la subendothéliale pauvre en anti-oxydants. Les macrophages possédant des récepteurs aux LDL oxydées, internalisent ces particules, formant ainsi des cellules dites spumeuses. À ce stade, la lésion n'empêche pas le sang de circuler normalement à travers le vaisseau et une régression reste même possible (Stevens et Lowe, 1997) (**figure I.2**)

I.1.2.2 La plaque fibreuse

En réponse à une réaction inflammatoire, les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses sécrètent toute une série de facteurs qui permettent à la lésion de progresser. Les cellules musculaires lisses de la média migrent vers la partie supérieure de l'intima, y prolifèrent et peuvent aussi se différencier en cellules spumeuses. D'autre part, les macrophages continuent à s'infiltrer et le nombre de cellules spumeuses ne fait donc qu'augmenter. Une partie de ces cellules spumeuses meurt à cause de la toxicité des LDL oxydées et forme le cœur nécrotique dans lequel sont également présents des cristaux de calcium, du cholestérol libre ou estérifié, des lymphocytes et parfois même des plasmocytes (Faggioto et Ross, 1984).

Les cellules musculaires lisses synthétisent et sécrètent les molécules de la matrice extracellulaire qui concourent à la formation de la chape fibreuse. Cette chape sépare le cœur nécrotique de la lumière des vaisseaux (Stevens et Lowe, 1997). Une néo-vascularisation de la paroi par les vaso vasorum provenant de l'adventice apparaît ensuite. À ce stade, la média s'est amincie et la lumière des vaisseaux s'est rétrécie à cause de la lésion (**figure I.2**)

I.1.2.3 La plaque d'athérome

L'évolution de la plaque se fait de façon longitudinale et circulaire tout en étant asymétrique. Cependant, il se peut qu'un phénomène de remodelage compensateur apparaisse et permette à la lumière du vaisseau de conserver un diamètre plus ou moins normal. Si la chape fibreuse est résistante, la plaque reste stable. Sinon, elle peut se rompre suite à des contraintes de cisaillement et à la présence de cellules spumeuses. Dans les artères de moyen calibre, la formation du thrombus après rupture de la plaque peut provoquer en cas d'occlusion du vaisseau, un infarctus dans la majorité des cas.

Il existe des facteurs extrinsèques et intrinsèques pour expliquer la rupture de la plaque. Un des facteurs intrinsèques est la composition de la plaque d'athérome au niveau de la chape fibreuse et du cœur nécrotique. Les plus instables sont celles qui possèdent une chape fibreuse fine et un cœur nécrotique plus important. Un second facteur est l'équilibre entre les molécules sécrétées par les différentes cellules comme l'IFN γ des lymphocytes T qui inhibe la production de collagène et donc la possibilité d'obtenir une chape résistante et le collagène produit par les cellules musculaires lisses (**figure I.2**).

1.1.3 Les modèles hypothétiques

Il existe plusieurs facteurs augmentant le risque d'athérosclérose. Parmi ceux-ci, on retrouve les risques dits mineurs qui tels l'obésité, le stress et la sédentarité. Les risques constitutionnels recouvrent l'âge, le sexe et les antécédents familiaux. Les risques majeurs quant à eux, sont l'hyperlipidémie, l'hypertension, le diabète sucré et le tabagisme. Pour expliquer la pathogénèse de l'athérosclérose, plusieurs hypothèses différentes ont été avancées. Ross et Glomset établirent pour la première fois en 1976 (Ross et Glomset, 1976) une **première hypothèse** qui fut modifiée en 1986 selon laquelle " les lésions initiales de l'athérome ne sont qu'une réponse à divers types d'agressions subies par l'endothélium artériel". Ces lésions peuvent être dues à une hypertension, un stress hémodynamique ou encore le tabagisme. Ces différents facteurs contribueraient à augmenter la perméabilité de la paroi, permettant aux composés plasmatiques, dont les LDL, de s'infiltrer. De plus, la perte d'intégrité de la paroi initie une réaction inflammatoire au cours de laquelle les monocytes sont recrutés. Les plaquettes, également activées, sécrètent des facteurs de croissance qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima. Les LDL s'accumulent et s'oxydent au niveau de la couche subendothéliale. Une fois oxydées, les LDL deviennent bioactives: elles exercent un effet chimiotactique recrutant de nouveaux monocytes et inhibent la mobilité des macrophages concourant également à la formation du cœur nécrotique. Elles activent également les cellules endothéliales.

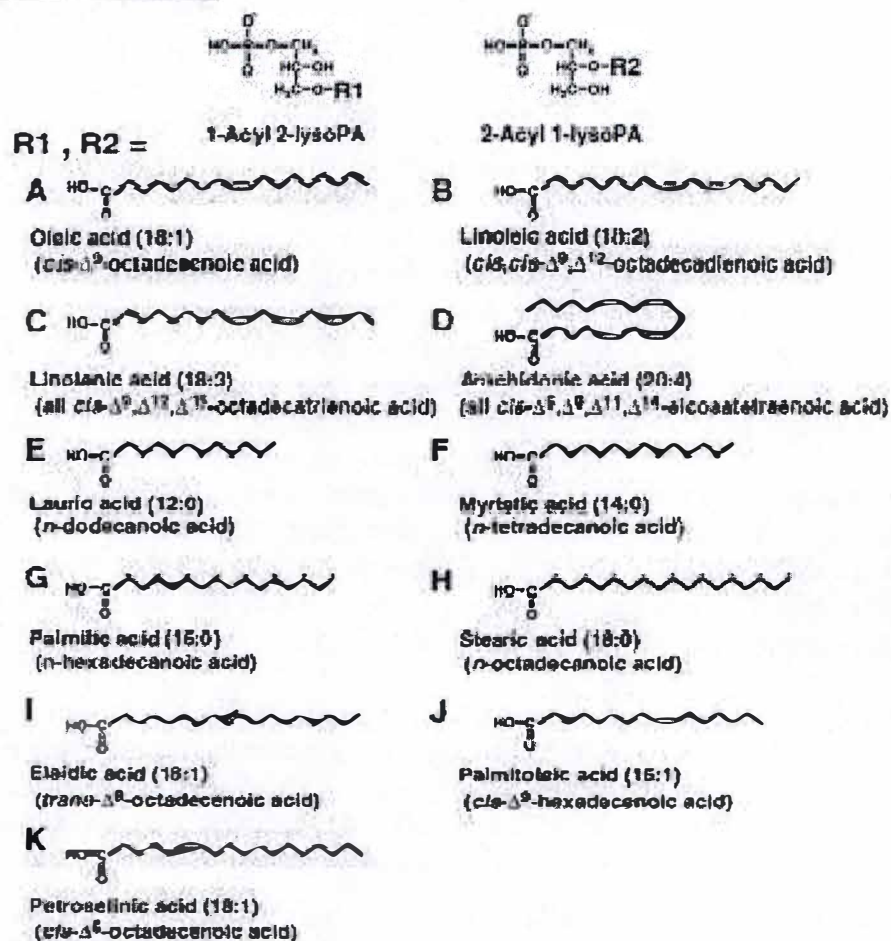
La **deuxième hypothèse** provient de l'observation faite par Bendit et Bendit selon laquelle certaines plaques semblent être constituées de cellules musculaires lisses monotypiques, c'est-à-dire dérivant d'un seul clone cellulaire (Bendit et Bendit, 1973). L'athérosclérose serait alors due à une anomalie primaire de la croissance des cellules musculaires lisses provoquée par des excès d'hydrates de carbones ou de cholestérol ou encore par un virus.

Une **troisième hypothèse** est celle de l'insudation lipidique. Les LDL pénétrant dans l'intima s'y oxydent et deviennent toxiques pour l'endothélium. Celui-ci y répond par l'initiation d'une réaction inflammatoire qui recrute les différents acteurs présents dans les lésions.

De nombreuses études ont démontré la présence de protéines ou de lipides oxydés dans les lésions, témoignant du fait que cette oxydation pouvait avoir lieu *in vivo* (Haberland et al., 1998). De plus, des auto-anticorps dirigés contre des épitopes de LDL oxydées ont été retrouvés circulant librement dans le sérum, ce qui renforce ce concept (Horkko et al., 2000). Des études supplémentaires immunocytochimiques ont démontré que ces LDL oxydées n'étaient présentes que dans les artères lésionnelles (Steinberg et Witzum, 1991). Les analyses de lipoprotéines extraites de lésions athérosclérotiques, ont montré les mêmes propriétés physico-chimiques que celles de LDL oxydées *in vitro* (Palinski et al., 1989). Il semblerait donc que l'oxydation reste faible dans le plasma étant donné la présence de nombreux composés ayant un pouvoir antioxydant tels que notamment les HDL via les enzymes qui lui sont associées (paraoxonase, PAF acétylhydrolase) ainsi que les vitamines C, E (Furlong et al., 1991). Ensuite, lorsque ces LDL partiellement oxydées pénètrent dans l'intima, l'oxydation se déroule de façon plus rapide. En effet, cette couche possède un potentiel antioxydant bien plus faible que le plasma.

Différentes études ont démontré l'habilité des LDL oxydées à interférer avec différentes régulations cellulaires. Par exemple, en théorie lorsqu'un macrophage a effectué son travail de nettoyage, ayant internalisé les débris cellulaires ou autres, il évacue le tissu concerné. Cependant les LDL oxydées inhibent cette migration, confinant le macrophage dans l'intima (Steinberg, 1989). Les LDL oxydées régulent également de manière positive des gènes codant par exemple pour le MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) dont le rôle est de recruter les

LPA species



LPA analogs

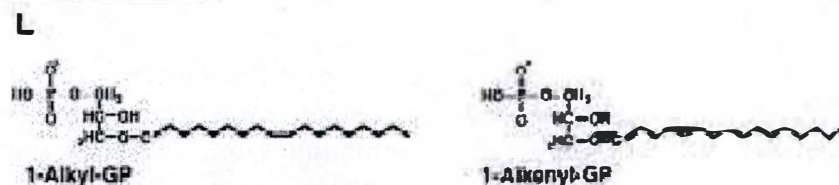


Figure I.3: Schéma représentant les différentes formes de LPA. Ces molécules présentent en position *sn*-1 ou *sn*-2 une chaîne d'acide gras et respectivement en position *sn*-2 ou *sn*-1 un groupement hydroxyle (Bandoh et al., 2000).

monocytes circulants (Goldstein et al., 1979). Tout ceci démontre l'importance du rôle joué par les LDL oxydées lors de l'athérogenèse.

Depuis quelques années, diverses études ont mis en évidence la formation de nombreux dérivés potentiellement bioactifs lors de cette étape d'oxydation des LDL. Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés à un composant lipidique appelé l'acide lysophosphatidique (LPA) (Cushing et al. 1990). Son action dans les processus athérosclérotiques est encore peu connue, toutefois plusieurs arguments laissent penser que ce composé pourrait fortement influencer le développement des lésions.

Le paragraphe suivant sera donc consacré à la description de la structure du LPA ainsi que ces différentes sources, celles-ci étant encore mal comprises pour le moment.

1.2 L'acide lysophosphatidique (LPA)

L'acide lysophosphatidique est une molécule de type glycérophospholipide connue depuis longtemps comme étant un intermédiaire dans la biosynthèse des phospholipides à la fois dans les cellules eucaryotes et procaryotes (Bishop et Bell, 1988).

Certains auteurs ont montré que la quantité de LPA présente dans les lésions athérosclérotiques est beaucoup plus élevée au niveau du cœur nécrotique là où la concentration en lipides est la plus importante. En effet, le taux moyen de LPA est parfois jusqu'à 13 fois supérieur dans les plaques athérosclérotiques (10 à 49 pmol/mg de tissu) par rapport à celui des artères normales (1,2 à 2,8 pmol/mg de tissu) (Siess et al., 1999). En parallèle à cela, il est également apparu depuis plusieurs années que le LPA pouvait jouer un rôle de messenger extracellulaire via sa liaison à des récepteurs couplés aux protéines G (Moolenaar, 1994) mais aussi interagir comme ligand intracellulaire pour le PPAR γ et ce dans divers types cellulaires.

Tout laisse donc à penser que le LPA puisse induire et perpétuer la réponse inflammatoire en cours au sein de la plaque d'athérome.

1.2.1 Structure du LPA

Le LPA est un 1-acyl-*sn*-glycéro-phosphate, c'est à dire une molécule constituée d'un squelette glycérol présentant en position *sn-1* une chaîne d'acide gras, en position *sn-2* un groupe hydroxyle, et un groupement phosphate en position *sn-3* (Jalink et al., 1994). Il existe également une variante de cette molécule de LPA, le 2-acyl-*sn*-glycéro-phosphate qui présente un groupement hydroxyle en position *sn-1* et une chaîne d'acide gras en position *sn-2*. Lorsque l'acide gras de substitution est en position *sn-1*, il peut former un lien acyl, alkyl ou alkényl avec le squelette de glycérol, par contre si la substitution se fait en *sn-2*, le lien est de type acyl (**figure I.3**).

Le squelette glycérol ne serait pas essentiel à l'activité de celui-ci, les facteurs déterminants étant la longueur, le degré d'insaturation et le type de liaison de l'acide gras au glycérol (Xu et al., 1998). Enfin, l'équipe de Jalink a observé à partir de cellules A431 de carcinome humain, que le remplacement du groupement phosphate dans le palmitoyl-LPA par des groupements phosphanate causait une perte d'activité presque totale, démontrant ainsi que sa présence est critique pour l'activité du LPA (données non publiées).

De façon générale, la meilleure activité a été mise en évidence à partir d'un squelette de glycérol sur lequel un acide gras de 16 ou 18 carbones est fixé par une liaison de type acyle (Xie et al., 2002).

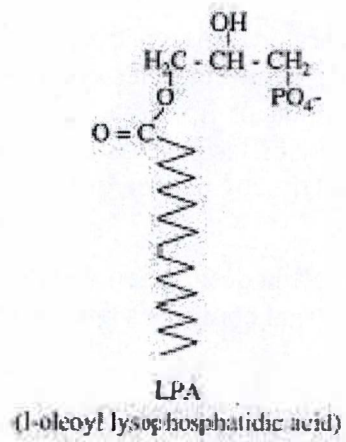


Figure I.4: Schéma représentant l'acide 1-oléyl lysophosphatidique, molécule de LPA utilisé au cours de ce mémoire (Goetz et Songzhu, 1998).

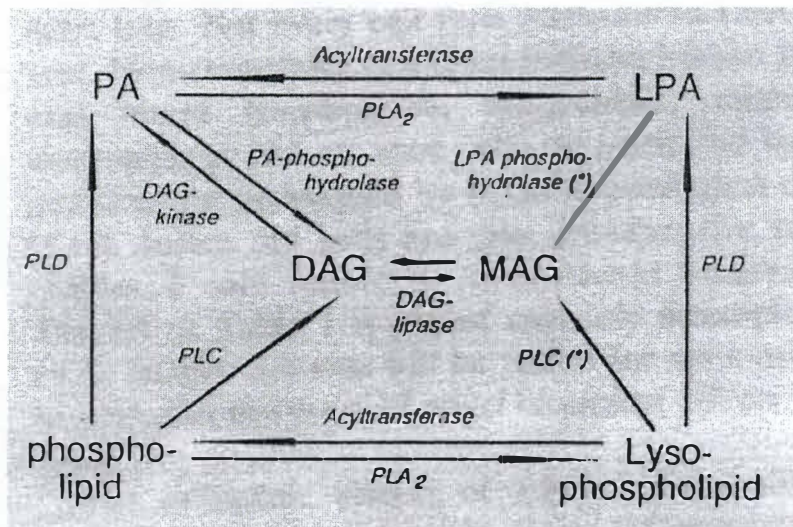


Figure I.5: Schéma résumant la formation de LPA suite à l'action des différentes enzymes (Jalink et al., 1994).

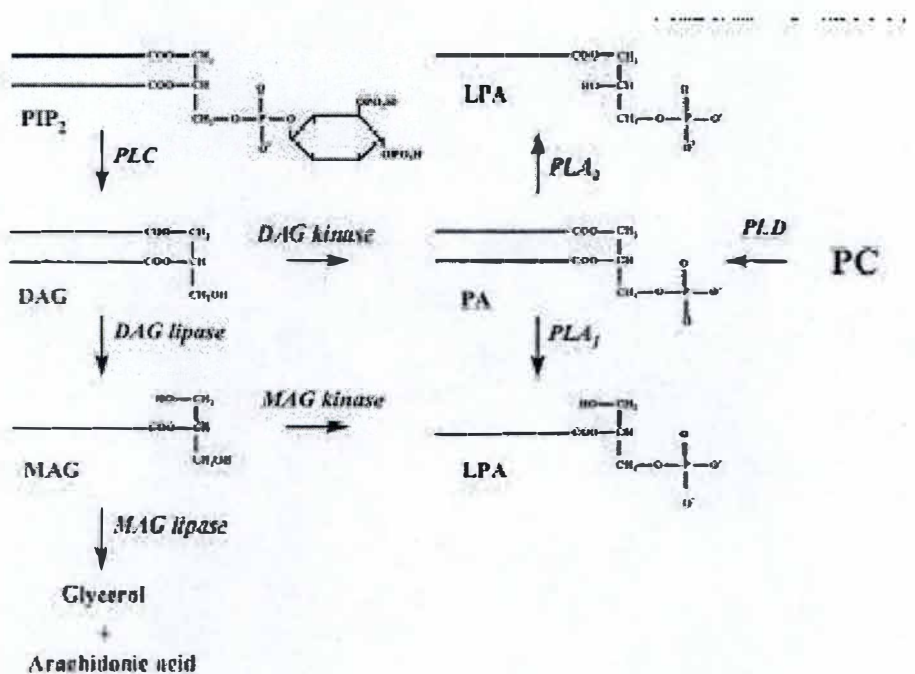


Figure I.6: Schéma représentant la voie de synthèse du LPA suite à l'activation de la PLC (Gaits et al., 1997).

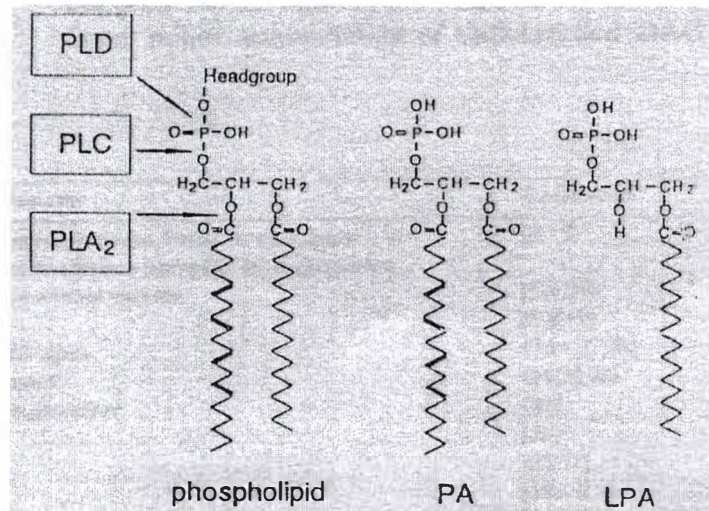


Figure I.7: Schéma représentant les sites de clivage des différentes phospholipases au niveau des phospholipides permettant la production de LPA (Jalink et al., 1995).

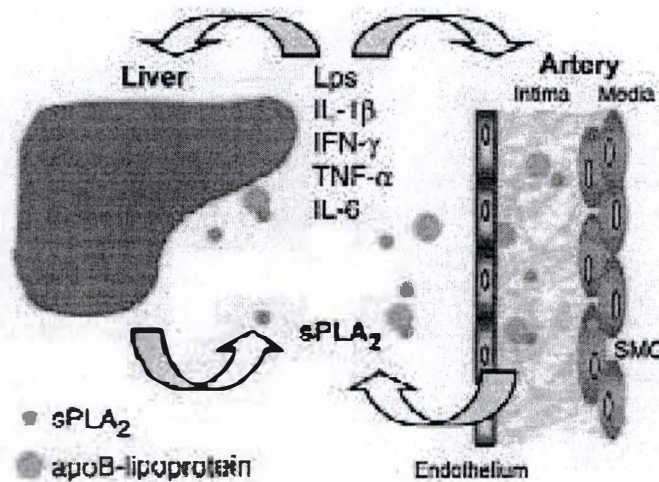


Figure I.8: Schéma illustrant la sécrétion de la phospholipase A₂ suite à l'activation de différents types cellulaires par des cytokines pro-inflammatoires (Camejo et al., 2000).

Dans le sérum humain, différentes formes acylées de LPA sont retrouvées (16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 20:4) (Xie et al, 2002) et les concentrations se situent entre 0,6 et 1 μ M (Gaits et al., 1997).

La forme de LPA qui a été utilisée au cours de ce mémoire présente en position *sn-1* un lien acyl avec l'acide oléique (**figure I.4**). Cette forme est capable d'activer les trois principaux récepteurs au LPA et est considérée généralement comme la plus efficace pour induire une large gamme de réponses cellulaires.

1.2.2 Les sources de LPA

Au niveau intracellulaire

Au niveau intracellulaire, une source majeure de LPA se trouve être le réticulum endoplasmique (Bishop et Bell, 1988) où la glycérol-3-phosphate acyl transférase catalyse sa production à partir du glycérol-3-phosphate avec un acyl-CoA comme donneur d'acyl. Le LPA peut aussi être produit à partir d'acyl-dihydroxyacétone phosphate par une réductase. Le LPA sert dans ce cas à former l'acide phosphatidique (PA), précurseur de tous les glycérophospholipides et n'aurait pas de rôle en tant que messenger intercellulaire.

Au niveau du sérum

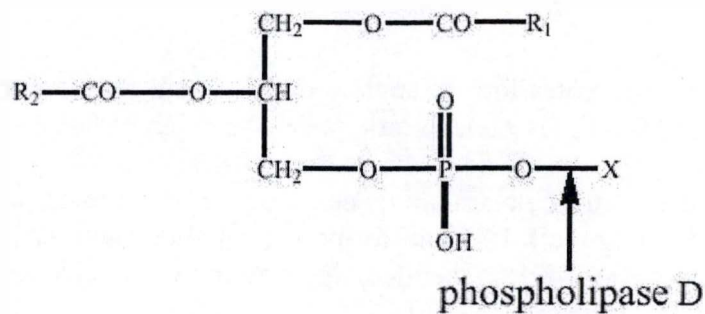
Le LPA peut aussi être produit dans le sérum. A ce niveau, le LPA se trouve sous une forme liée à l'albumine, limitant d'une part son activité biologique et le protégeant d'autre part de l'hydrolyse par les phospholipases du sérum (Tigyi et Miledi, 1992).

Les plaquettes activées constituent la majeure source de LPA (Gerard et Robinson, 1989). Lorsque les plaquettes sont incubées en présence de thrombine, celles-ci s'activent et il s'en suit alors une cascade d'événements. La thrombine se fixe en premier lieu sur son récepteur en membrane des plaquettes, ce qui provoque l'activation de celui-ci. Il interagit alors avec une protéine G qui causera l'activation de la phospholipase C (PLC). Tout d'abord, celle-ci catalyse l'hydrolyse de l'inositol triphosphate en diacylglycérol (DAG). DAG qui peut par après prendre différentes directions:

- Soit il subit l'action de la diacylglycérol lipase le convertissant en monoacylglycérol (MAG), pouvant être phosphorylé par une MAG kinase pour former du LPA ou encore être hydrolysé par la MAG lipase pour former du glycérol et de l'acide arachidonique (Gaits et al., 1997).
- - Soit le DAG se fait phosphoryler par la DAG kinase afin de former du PA qui peut être réincorporé dans les phospholipides cellulaires, servir de réserve de DAG pour activer la PKC ou encore être le précurseur du LPA (Jalink et al., 1994) (**figures I.5 et I.6**).

La formation de LPA à partir de PA se fait via une **PLA₂** (phospholipase A₂) qui déacyle celui-ci. Cette enzyme hydrolyse en fait le lien ester du phospholipide en position *sn-2* formant à la fois un lysophospholipide et un acide gras non estérifié (Dennis et Six, 2000) (**figure I.7**).

La PLA₂ existe également sous forme sécrétoire (sPLA₂-IIA) (Camejo et al., 2001). Elle est produite par différents types cellulaires suite à une stimulation par différentes cytokines pro-inflammatoires et s'accumule dès lors dans le plasma (Foucarde et al., 1995) (**figure I.8**). Elle y catalyserait l'hydrolyse de phospholipides membranaires au niveau des plaquettes activées, en lysophospholipides tels que la lysophosphatidylcholine (LPC), la lysophosphatidyléthanolamine (LPE) et la lysophosphatidylsérine (LPS) (Yokoyama et al., 1995). Ces lysophospholipides sécrétés par les plaquettes seraient par après convertis en LPA suite à l'action d'une lyso-PLD.



R_1 and R_2 = fatty acid

X = an organic molecule

Figure I.9: Schéma illustrant l'action de la phospholipase D
(http://bric.postech.ac.kr/.../feb/2-1/neuro02-1_PLD.html)

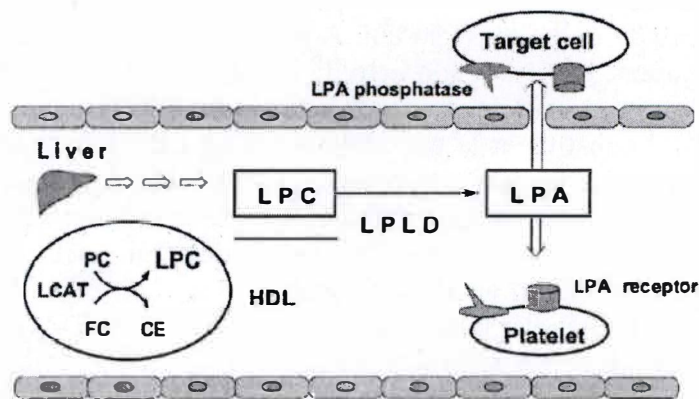


Figure I.10: Schéma représentant les différentes sources de lysophosphatidylcholine et l'action de la LPLD sur celle-ci (Tokumura, 2002)

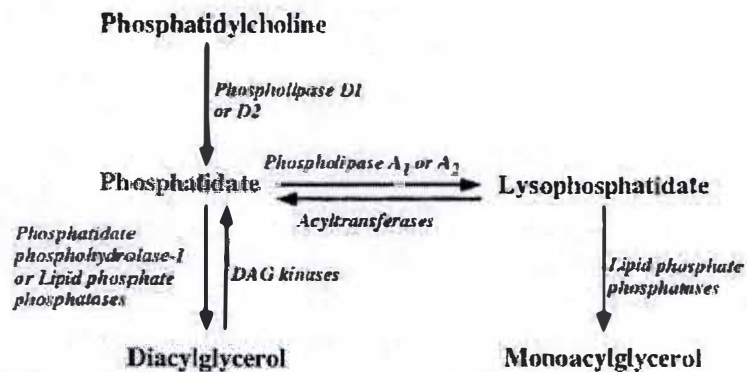


Figure I.11: Schéma décrivant l'action des lipide phosphate phosphatases intervenant dans la régulation négative du LPA (Pilquill et al., 2001).

Cell	Agonist	Location
Mast cell lines (RBL-2H3)	antigen	cells
Ovarian cancer cell lines (OCC1, HEY, OVCAR-3)	PMA	medium
Platelet (human)	LPA thrombin	cells
Adipocyte (human)	UK 14304 (α_2 -adrenergic agonist)	plasma medium
Neutrophils (human)	myristate	cells
Fibroblast cell line (Balb/c 3T3)	PDGF	cells
Pheochromocytoma cell line (PC12)	PMA	cells
Prostate cancer cell lines (PC-3) (Dul45)	bombesin LPA	cells, medium medium

Tableau I.1: Liste des agonistes qui induisent la production de LPA dans des types cellulaires différents (Xie et al., 2002).

Le LPLD (lysophospholipase D) est une métalloenzyme extracellulaire requérant la présence d'ions zinc, calcium, magnésium ou encore nickel pour fonctionner (Tokumura et al., 1998). Parmi ses activités, l'une des plus étudiées est l'hydrolyse du lien phosphatidylcholine acyl ou alkyl (Xie et al., 2002) (**figure I.9**). Outre l'action déjà mentionnée sur les lysophospholipides des plaquettes, la LPLD hydrolyse les lysophospholipides tels que la lysophosphatidylcholine libérée par le foie ou bien produite via la lécitine/cholestérol acyl transférase (LCAT) dans les HDL en LPA (Sekas et al., 1985). Une partie de ce LPA est converti en MAG par une LPA phosphatase (Tokumura, 2002). (**figure I.10**)

Les LPC présentes sur la membrane des érythrocytes pourraient également servir comme substrats de la lyso-PLD (Aoki et al., 2002).

Au niveau des autres cellules

D'autres cellules et tissus pourraient également sécréter de manière constitutive ou induite du LPA via l'action combinée d'une phospholipase D (LPD) et d'une PLA₂. Cette voie de production a été particulièrement étudiée dans des cellules cancéreuses ovariennes (Eder et al., 2000). La PLD catalyse la conversion d'une PC en PA. Une PLA₂ hydrolyse ensuite le lien ester en *sn*-2 pour générer du LPA. Plusieurs isoformes de PLA₂ pourraient catalyser cette dernière hydrolyse (Eder et al., 2000). La PLD pourraient également générer du LPA directement à partir de LPC préexistante.

Les voies de synthèse du LPA sont donc variées et complexes. Cette production est en outre régulée par divers agonistes comme illustré dans le **tableau I.1**.

Au niveau des LDL

Enfin, le LPA peut aussi être produit dans des LDL faiblement oxydées où la concentration en LPA augmente de 5 à 6 fois au cours de l'oxydation. Le LPA s'accumule donc dans les lésions athérosclérotiques. L'une des causes de cette accumulation pourrait être la sécrétion de la sPLA₂ induite dans le contexte pro-inflammatoire de cette pathologie. Cette sPLA₂ hydrolyserait les phospholipides des LDL (Siess et al., 1999; Siess et al., 2002).

Enfin, signalons que la bactérie *Chlamydia pneumoniae* produirait du LPA via sa PLD à partir des phosphatidylcholines présentes dans les ox-LDL ou présentes sur le feuillet membranaire externe des cellules. Ces bactéries ont notamment été retrouvées au niveau des lésions athérosclérotiques (Kalman et al., 1999).

Pour terminer, le LPA est dégradé en monoglycérides lorsque la lipide phosphate phosphatase (LPP) le déphosphoryle (Roberts et al., 1998). Celle-ci est exprimée en partie au niveau de la membrane plasmique de la cellule ou encore sur le feuillet luminal intracellulaire de la membrane, ce qui implique que son site actif se trouve soit du côté extracellulaire, soit du côté luminal d'organites tels que le réticulum endoplasmique ou encore l'appareil de golgi. Elle peut donc déphosphoryler des substrats extracellulaires sans qu'ils soient transportés à l'intérieur de la cellule, ce qui fait d'elle une "ecto-enzyme" (**figure I.11**). Cependant le rôle de cette protéine est controversé et ne se limite vraisemblablement pas à une simple activité de dégradation (Jasinska et al., 1999).

I.2.3 Les effets du LPA

C'est au milieu des années 1980 que le LPA fut reconnu en tant que facteur de croissance par l'équipe de Moolenaar (Moolenaar et al., 1986). Il fut notamment démontré que le LPA pouvait induire divers effets dont l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC), l'augmentation d'inositol triphosphate, de calcium intracellulaire, d'incorporation de thymidine tritiée et l'activation de la PKC (Contos et al., 2000). D'autres auteurs ont mis en avant un effet du LPA sur l'agrégation plaquettaire, la contraction des muscles lisses directement ou via la

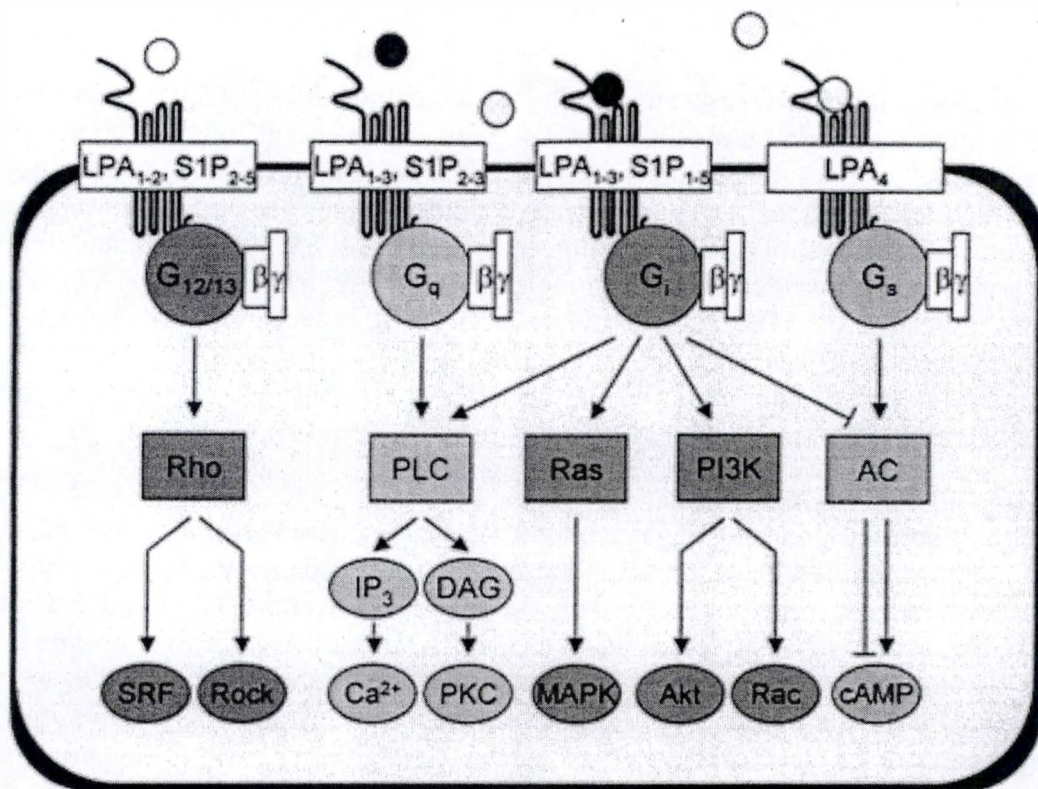


Fig I.12: Voies de signalisation activées par la liaison du LPA à ses récepteurs membranaires. Ceux-ci sont couplés à différents types de protéines G permettant dès lors d'activer des voies de signalisation différentes. (Ankiler and Chun, 2003)

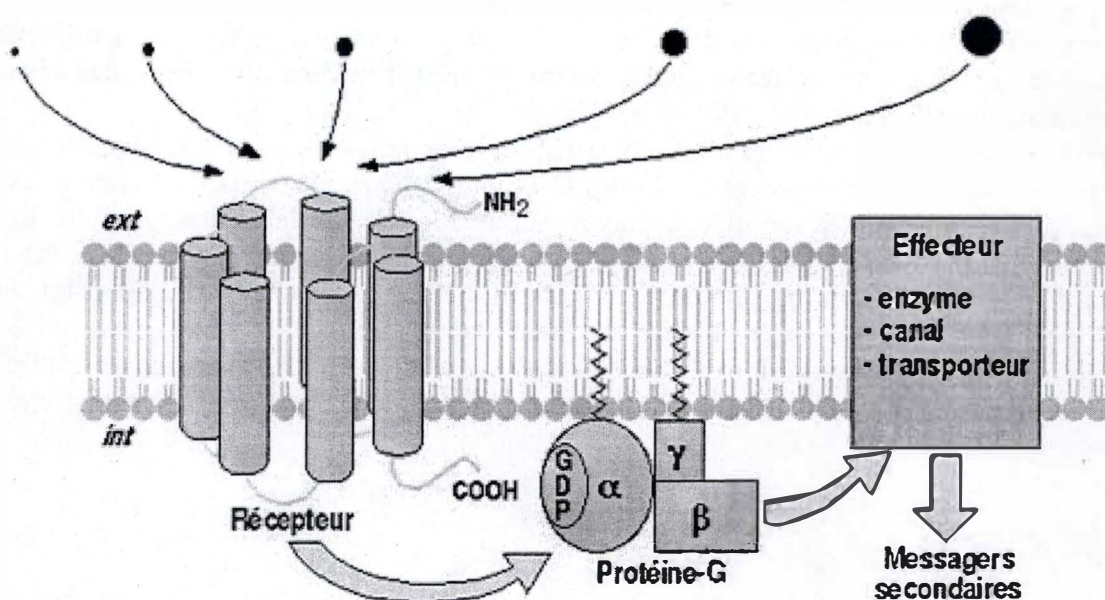


Figure I.13: Représentation schématique des récepteurs membranaires couplés aux protéines G ([http:// www.chez.com/rcpg/partie4.htm](http://www.chez.com/rcpg/partie4.htm)).

Receptor ^a	Synonyms	Ligands	Agonists	Antagonists
LPA ₁	VGZ-1 EDG-2 mrec1.3 GPCR 26 LP _{A1}	LPA (high affinity)	Several NAEPA derivatives	Suramin (low specificity); DGPP 8:0 and PA 8:0 (weak antagonists); Ki16425; FAP-12 (weak antagonist); VPC12249
LPA ₂	EDG-4 _(non-mutant) LP _{A2}	LPA ($K_d = 73.6$ nM)	Several NAEPA derivatives; FAP-10; FAP-12	
LPA ₃	EDG-7 LP _{A3}	LPA ($K_d = 206$ nM)	Several NAEPA derivatives; OMPT; a monofluorinated analog of LPA	DGPP 8:0; PA 8:0; Ki16425; FAP-12; VPC12249
LPA ₄	P2Y ₉ GPR23	LPA ($K_d = 45$ nM)		
S1P ₁	EDG-1 LP _{B1}	S1P ($K_d = 8-13$ nM); dh-S1P; SPC (low affinity)	FTY720 and an analog, (R)-AAL, after phosphorylation to FTY720-P (Compound A) and (R)-AFD; SEW2871	
S1P ₂	AGR16 H218 EDG-5 LP _{B2}	S1P ($K_d = 20-27$ nM); dh-S1P; SPC (low affinity)		Pyrozolopyridine derivative named JTE-013
S1P ₃	EDG-3 LP _{B3}	S1P ($K_d = 23-26$ nM); dh-S1P; SPC (low affinity)	FTY720-P (Compound A) and (R)-AFD	Suramin
S1P ₄	EDG-6 LP _{C1}	PhS1P ($K_d = 1.6$ nM) S1P ($K_d = 13-63$ nM); dh-S1P; SPC (low affinity)	FTY720-P (Compound A) and (R)-AFD	
S1P ₅	NRG-1 EDG-8 LP _{B4}	S1P ($K_d = 2-10$ nM); dh-S1P; SPC (low affinity)	FTY720-P (Compound A) and (R)-AFD	

Tableau I.2: Liste des différents noms des récepteurs au LPA ou S1P ainsi que celui de leurs agonistes et antagonistes respectifs (contos et al., 2000).

libération d'agents vasoactifs tels que l'endothéline-1 (Yakubu et al., 1997), la chimiotaxie, l'invasion de cellules tumorales, la différenciation des cellules musculaires lisses, la rétraction des neurites ou encore des réarrangements du cytosquelette par la formation des fibres de stress et d'adhésion focale (Schumacher et al., 1979). Il a aussi été montré que le LPA provoquait la prolifération des fibroblastes (Jalink et al., 1994), augmentait l'expression de molécules d'adhérence telles que la E-selectine, la VCAM-1 chez les cellules endothéliales et pouvait promouvoir la survie des lymphocytes T (Goetz et al., 1999).

Afin d'approfondir les connaissances sur le LPA, d'autres tests ont été menés révélant par exemple que l'utilisation de la toxine pertussique permet d'inhiber complètement l'effet mitogène du LPA. Etant donné que cette toxine a une activité ADP-ribosyl transférase qui lui permet d'interférer avec des protéines G, cela a permis de suspecter l'importance des protéines G dans les mécanismes moléculaires d'action du LPA.

Les protéines G étant des protéines couplées à des récepteurs à sept passages transmembranaires, cela sous-entend l'existence de récepteurs membranaires au LPA (Tigyi et al., 1998) (**figure I.12**). D'autre part, de récentes études faites par McIntyre et ses collègues, ont démontré que le LPA était aussi un ligand à haute affinité d'un récepteur : le facteur PPAR γ (McIntyre et al., 2002).

Nous allons décrire dans un premier temps en plus amples détails ce que sont les récepteurs membranaires au LPA couplés aux protéines G ainsi que les voies de signalisation en aval de ces récepteurs.

I.3. Les récepteurs au LPA

I.3.1 Les récepteurs membranaires

Les récepteurs membranaires au LPA sont appelés depuis les années 1990, les récepteurs EDG (Endothelial Differentiation Gene). Ce terme décrit à l'origine un récepteur orphelin couplé aux protéines G, encodé par des gènes de réponse précoce clonés à partir de cellules endothéliales HUVEC (Hla et Maciag, 1990). Les récepteurs de la famille EDG se subdivisent en deux grands groupes: les récepteurs LPA reconnus par le LPA et les récepteurs SIP reconnus par la sphingosine-1-phosphate (Lynch, 2002). Récemment, les récepteurs EDG ont reçu une nouvelle appellation par le NC-IUPHAR (The International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification). Ils sont nommés selon l'abréviation de leur ligand le plus affin suivi d'un nombre arabe permettant de distinguer les différentes isoformes (**tableau I.2**). Nous nous focaliserons dans ce travail sur les récepteurs LPA, au nombre de quatre: LPA1, LPA2, LPA3, LPA4. Les trois premiers sont conservés, tandis que le LPA4 montre une séquence divergente qui l'apparente plus au récepteur au PAF (platelet activating factor) (pour une revue récente, voir Ankiler et Chun, 2004).

I.3.1.1 Structure des récepteurs au LPA

Comme nous venons de le signaler, les récepteurs au LPA sont couplés à des protéines G. Ces GPCRs (G Protein Coupled Receptors) interagissent avec les quatre classes de protéines G hétérotrimériques que sont les G $_s$, G $_{i/o}$, G $_{12/13}$, G $_q$. Ces récepteurs membranaires sont constitués de sept hélices transmembranaires hydrophobes reliées par des boucles extra- et intracellulaires. Il semble que la boucle entre les hélices V et VI du côté cytoplasmique soit responsable de l'interaction avec les protéines G et plus précisément avec la région C-terminale au niveau des 5 derniers résidus de la sous-unité α (Hamm, 1998). Les GPCRs possèdent une extrémité N-terminale extracellulaire et C terminale intracellulaire. (**figure I.13**). Ils présentent une structure tridimensionnelle comparable à celle des autres GPCRs, comme les récepteurs alpha ou bêta adrénergique, muscarinique et bien d'autres (Baldwin,

Distribution tissulaire des récepteurs au LPA	LPA1	LPA2	LPA3	LPA4
Cerveau	+++	+ à 0	0	
Cœur	+++	+ à 0	++ à +	
Colon	+++	+ à 0	0	
Foie	+ à 0	+ à 0	0	
Intestin grêle	+++	+ à 0	0	
Leucocytes	+ à 0	+++	0	
Muscle strié squelettique	+++	+ à 0	0	
Ovaire	+++	+ à 0	++	
Pancreas		++	+++	
Placenta	+++	+ à 0	0	
Poumons	+ à 0	+ à 0	++	
Prostate	+++	++	+++	
Rate	+++	++	0	
Rein	+++	+ à 0	0	
Testicule	+++	+++	+++	
Thymus	+ à 0	++	0	

Tableau I.3: Distribution tissulaire des récepteurs au LPA. +++ = très abondant ++ = abondance moyenne + = faible abondance 0= pas exprimé

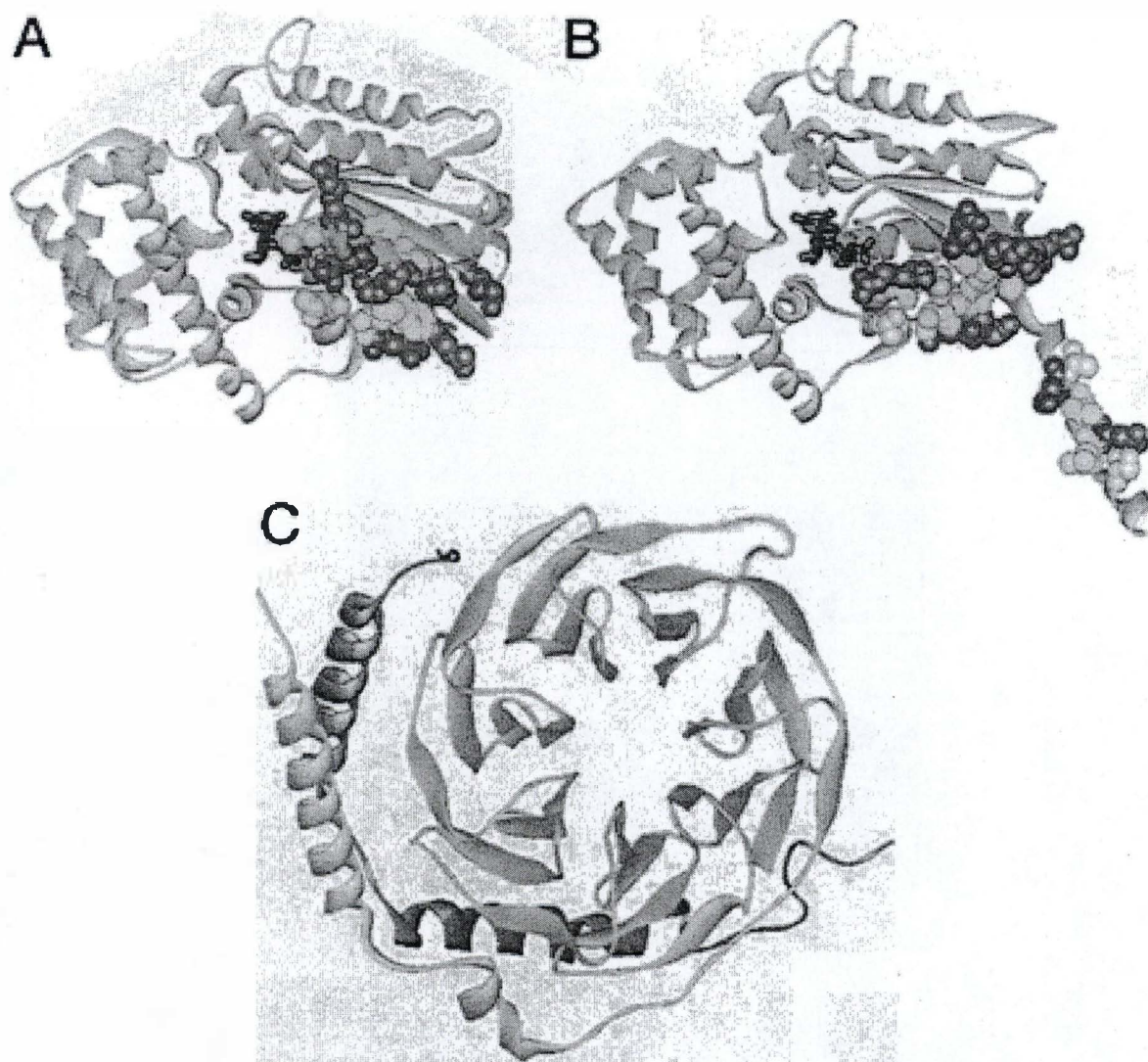


Figure I.14: Modélisation en trois dimensions des sous-unités des protéines G.

En A: La liaison de la sous-unité α au GTP.

En B: La sous unité α liée au GDP.

En C: La sous-unité γ est représentée en couleur claire et la sous-unité β en couleur foncée (Hamm, 1998).

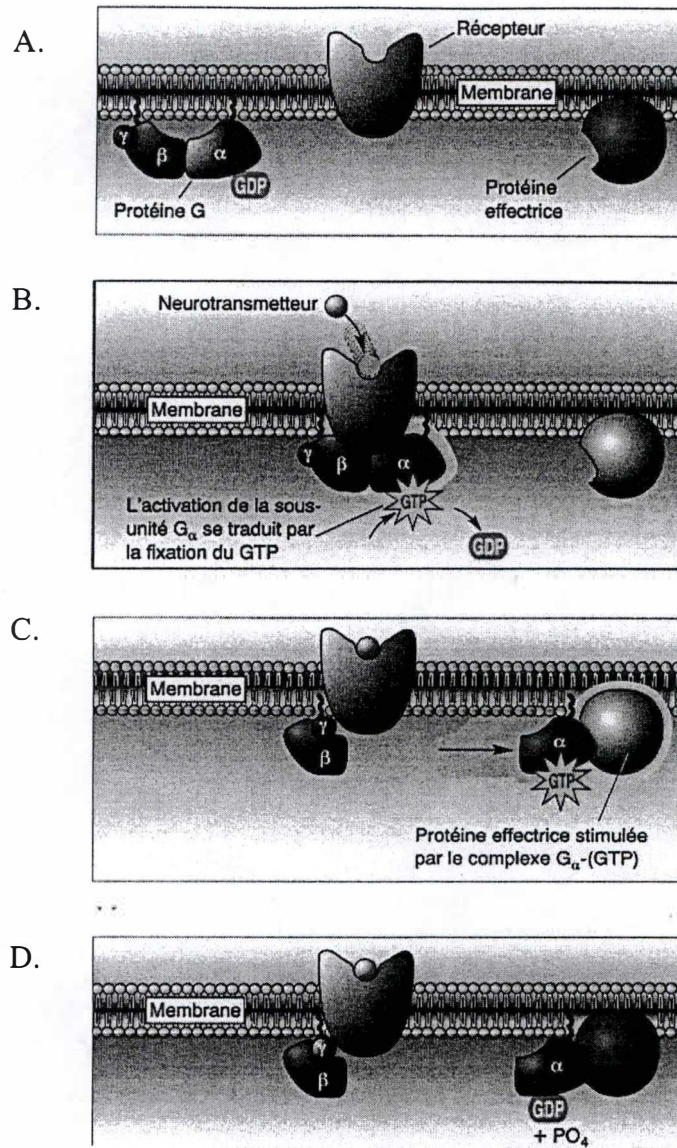


Figure I.15: Schéma d'activation des protéines G.

En A.: Protéine G au repos: la sous-unité α est liée au GDP.

En B.: une fois le ligand fixé à son récepteur, le GDP est remplacé par du GTP ce qui permet à la sous-unité α de se délocaliser et de se fixer à l'effecteur (en C.).

En D.: une fois le GTP hydrolysé en GDP, le complexe G_α -GTP retourne en membrane reformant un hétérotrimère avec le complexe $\beta\gamma$.

(<http://www.medecine.unige.ch/.../neurotran/metabo.html>)

1994). Les LPA1, LPA2, LPA3 et LPA4 sont constitués de respectivement 364, 351, 353 et 370 acides aminés chez l'homme et ont un poids moléculaire estimé à 41,2; 39,1 40,1 kDa et 42 kDa.

I.3.1.2 Localisation tissulaire des récepteurs au LPA

La distribution tissulaire des récepteurs au LPA semble assez large et semblable pour les trois isoformes, les différences provenant surtout du niveau d'expression de chacun de ceux-ci dans un tissu. Un tableau résume les principales localisations tissulaires de ces récepteurs (tableau I.3).

I.3.1.3 Structure et mécanisme d'activation des protéines G

Les protéines G sont les médiateurs de la transmission de l'information reçue par le récepteur membranaire et traitée par l'effecteur. Elles sont constituées de trois sous-unités fonctionnelles différentes (α , β , γ) formant un complexe hétérotrimérique.

Chaque sous-unité est encodée par des gènes différents.

Les **sous-unités α** sont encodées par au moins 17 gènes et réparties en quatre classes (G_s , G_q , G_i , G_{12}) qui diffèrent par la composition quantitative et qualitative en acides aminés, par l'effecteur et le récepteur membranaire auxquels elles sont couplées ainsi que par l'action exercée sur cet effecteur (Sternweis, 1994). La sous-unité α possède deux domaines: un premier domaine de liaison et d'hydrolyse du GTP appelé " le domaine G" et un deuxième domaine hélicoïdal servant à enfouir le GTP à l'intérieur de la structure de la protéine (Noel et al., 1993).

La **sous-unité β** possède une structure composée d'une hélice à sept palmes basées sur la répétition d'un motif 7 WD-40 et possédant un pore rempli d'eau. Elle interagit avec la sous-unité γ via une boucle N-terminale (Sondek et al., 1996).

La **sous-unité γ** possède quand à elle, une structure en hélice α . (figure I.14)

L'activation de ces protéines repose sur un échange entre guanosine diphosphate et triphosphate (GDP/GTP). De plus, l'efficacité de transduction est fonction de la balance entre cet échange et le taux d'hydrolyse du GTP (Ross et Wilkie, 2000).

A l'état de repos, la sous-unité α lie du GDP de façon non covalente et forme un complexe hétérotrimérique avec les sous-unités $\beta\gamma$. Cet hétérotrimère est ancré en membrane par des ancres lipidiques présentes au niveau des sous-unités α et γ . Lors de la liaison du ligand à son récepteur, les hélices 3 et 6 du récepteur changent de conformation ce qui modifie ensuite celle des loops intracellulaires interagissant avec les protéines G. Ce mouvement découvre ainsi un site de liaison jusqu'alors enfoui. C'est au niveau du troisième loop intracellulaire que l'interaction avec la sous-unité α peut se faire (Farrens et al., 1996). Le GDP, dont l'affinité pour la sous-unité α diminue suite à une modification des interactions interdomaines de celle-ci, est remplacé par du GTP. Le complexe G_α -GTP se dissocie alors de la sous-unité $\beta\gamma$ et se fixe à l'effecteur, y induisant à son tour un changement de conformation qui active celui-ci (Hamm, 1998). Cette activation est transitoire étant donnée l'existence d'une activité intrinsèque GTPasique de la sous-unité α . Une fois le GTP hydrolysé en GDP, le complexe G_α -GDP retourne en membrane pour former un hétérotrimère avec le complexe $\beta\gamma$ (figure I.15).

Il est apparu que l'activation des récepteurs au LPA pouvait mener à l'induction de toute une série d'événements parmi lesquels peuvent être cités l'activation de la PLD, la PLC, des Mitogen Activated Protein (MAP) kinases, de la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K), la protéine rho,... (Moolenaar, 1995).

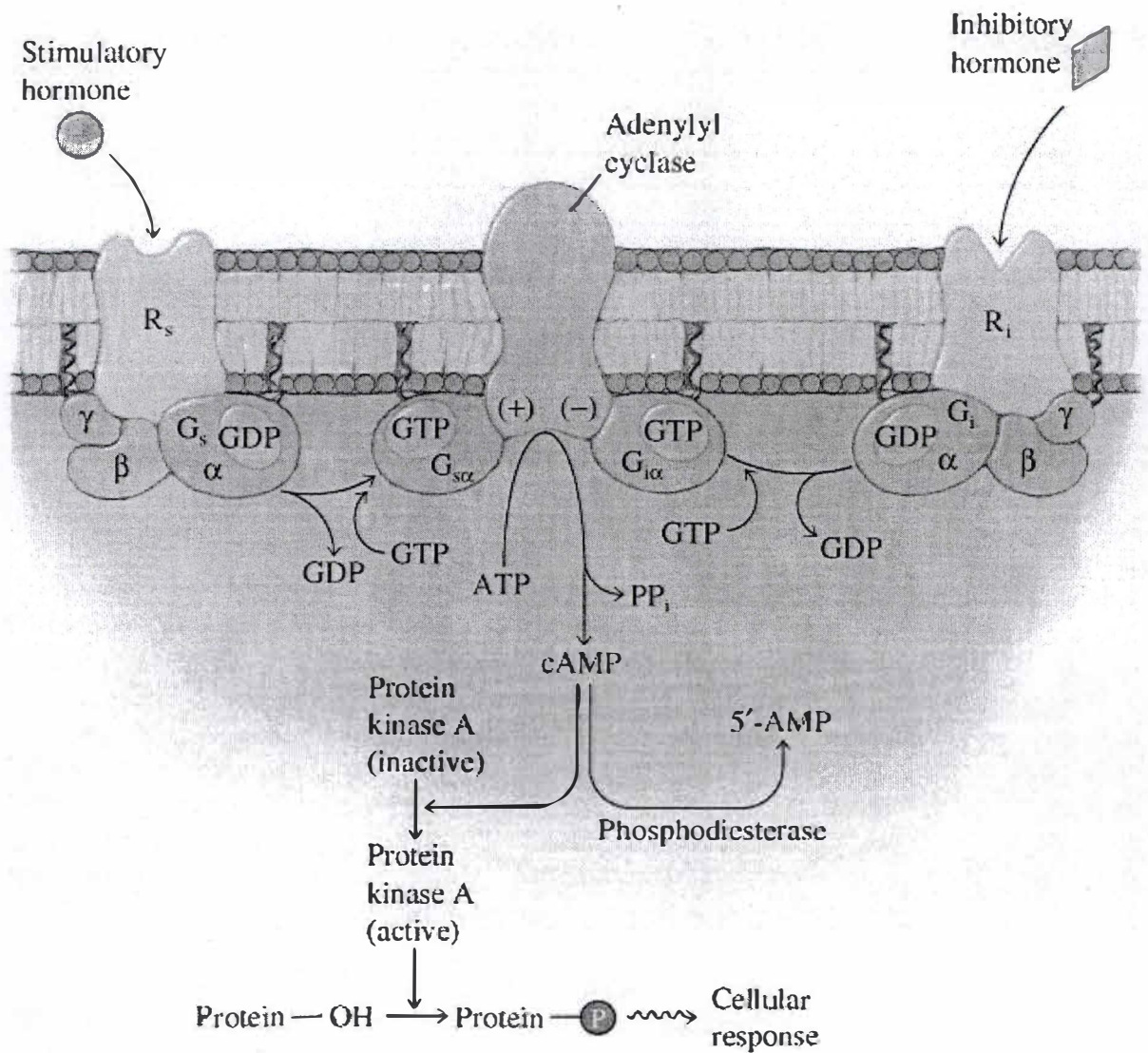


Figure I.16 : Schéma illustrant l'activation et l'inhibition de l'adénylate cyclase par les sous-unités des protéines G de type G_s et G_i.
http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media-portofolio/text-images/FG09_43_90201

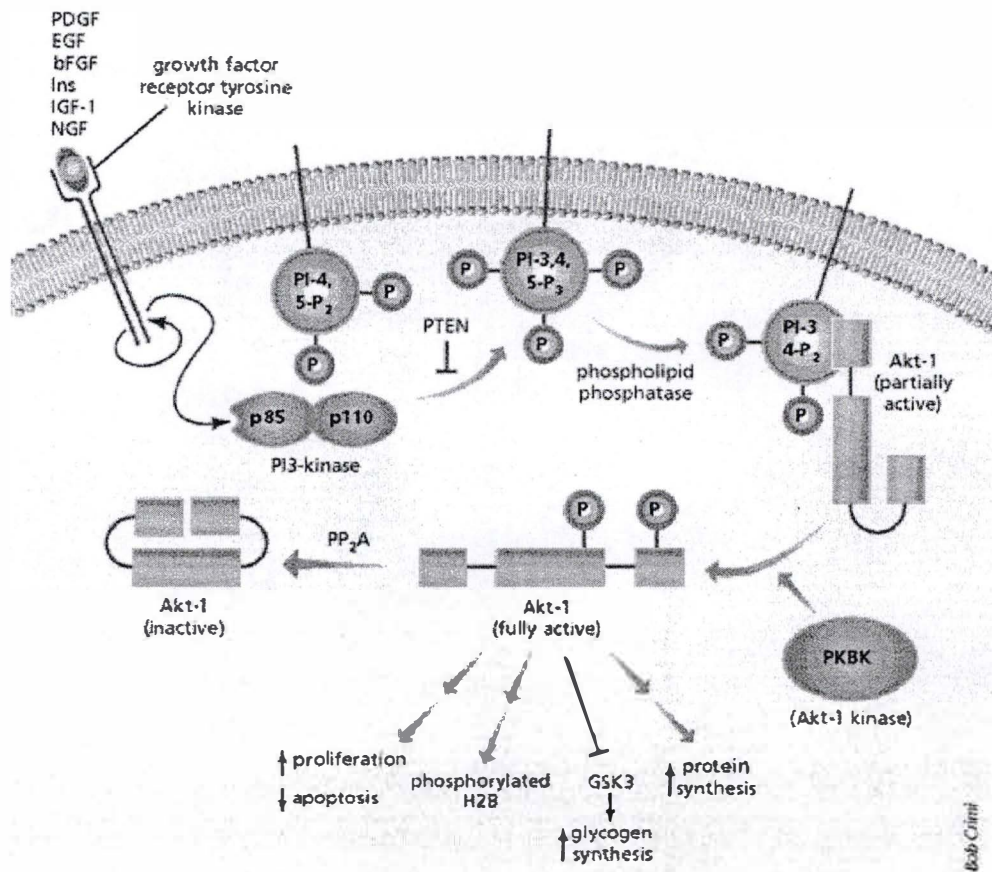


Figure I.17 : Schéma illustrant la voie de signalisation de la PI3 kinase conduisant à la prolifération et à la survie cellulaire.
[http:// www.nature.com/.../n1/fig_tab/ng0199_64_F2.html](http://www.nature.com/.../n1/fig_tab/ng0199_64_F2.html)

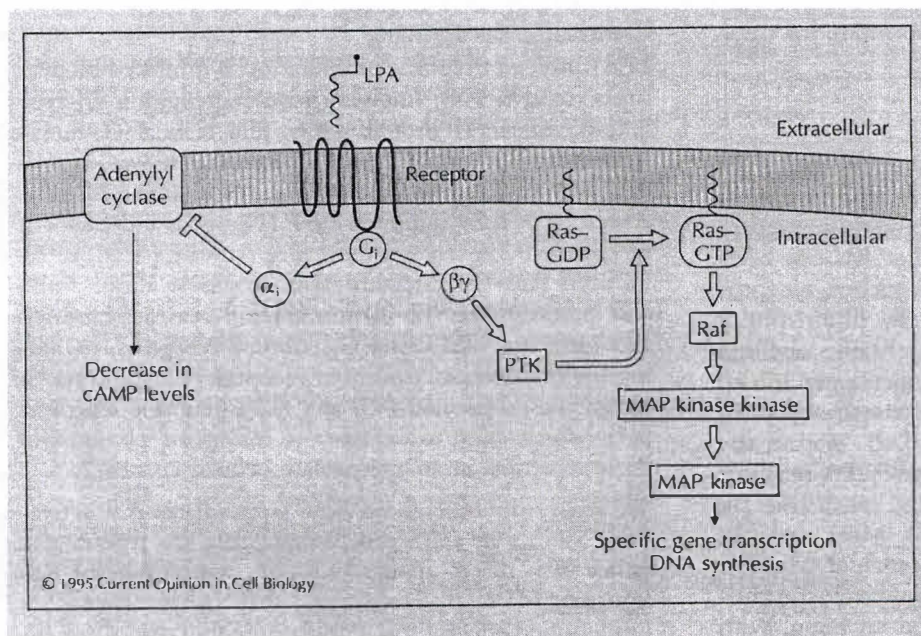


Figure I.18: Schéma représentant l'activation de la voie des MAP kinases via la protéine Ras suite à la liaison du LPA à son récepteur (Moolenaar, 1995).

I.3.1.4 Voies de signalisation activées par le LPA

Différentes classes de protéines G sont couplées aux récepteurs au LPA. LPA1 et LPA2 sont couplés aux protéines G de la famille $G_{i/o}$, G_q et $G_{12/13}$. LPA3 pour sa part, ne serait couplé qu'aux deux premières. LPA4 est couplé aux protéines G de la famille G_s (Anliker et Chun, 2004) (**figure I.12**).

Nous allons maintenant tenter de comprendre les mécanismes de signalisation des différentes voies activées par la liaison du LPA à ses récepteurs, qui varient selon la nature de l'effecteur régulé par la protéine couplée au récepteur. Ces effecteurs sont:

L'adénylate cyclase (AC)

L'adénylate cyclase est activée par les protéines de la famille G_s (cas du LPA4) et est inhibée par les protéines de la famille G_i (cas du LPA1-3) (Reithmann et al, 1990).

Lorsque le LPA se lie au LPA4 associé aux protéines G de types G_s , la concentration en AMPc formé suite à l'hydrolyse d'un groupement pyrophosphate de l'ATP augmente. Cette augmentation inhibe l'action proliférative de molécules comme les facteurs de croissance ou encore le LPA lui-même. En effet, lorsque le LPA se lie aux LPA1-3, l'activation du complexe G_i provoque la dissociation de la sous-unité α du complexe $\beta\gamma$ et l'inhibition de l'AC par cette sous-unité (Parhami et al., 1995) (**figure I.16**).

La phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K)

Le LPA possède un effet sur la survie cellulaire médié par la voie de signalisation $G_{i/o}$ / (PI3K)/Akt. Les PI3K font partie d'une famille de lipide kinases comprenant trois classes. Nous nous limiterons ici aux PI3K de classe I principalement impliquées dans les processus de signalisation mitogénique. La classe I est composée de tous les hétérodimères comprenant une sous-unité catalytique retrouvée sous 4 isoformes ($p110 \alpha, \beta, \gamma, \delta$) et associée à une sous-unité régulatrice (voir par exemple, Yart et al., 2002). La PI3K est activée par les protéines de la famille G_i , ce qui est le cas des récepteurs LPA1-3 (Ye et al., 2002). Comme l'indique son nom, elle phosphoryle en position 3' l'anneau inositol de phosphoinositides. Son activation aboutit à la formation de composés comme le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate ($pdtIns(3,4,5)P_3$) qui médie l'activation d'une sérine/thréonine kinase Akt/PKB (protéine kinase B) ainsi que celle d'une kinase dépendante des phosphoinositides (PDK), responsables du contrôle de la prolifération cellulaire et de la survie (Rameh et Cantley, 1999).

Akt/PKB est donc un effecteur en aval de la PI3K. Son activation est indispensable pour la survie cellulaire médiée par le LPA (Weiner et Chun, 1999). Cependant la manière dont l'activation de Akt mène à la survie cellulaire reste mal comprise (**figure I.17**). Il est important de noter que le LPA ne possède pas que des effets bénéfiques pour la survie des cellules, mais qu'il peut induire l'apoptose de façon dépendante du type cellulaire. Signalons par ailleurs que les sous-unités catalytiques de la PI3K ont aussi une activité protéine kinase intrinsèque, qui semble critique pour promouvoir la phosphorylation de MEK et donc l'activation de la cascade de ERK1/ERK2 (extracellular regulated kinase 1-2).

La petite protéine G Ras et la voie des MAPK

Le LPA possède des effets pro-prolifératifs médiés par l'induction et par la liaison du facteur SRF (serum response factor) et du TCF (ternary complex factor) sur les SRE (serum response element) présents dans les promoteurs de gènes liés à la croissance (Goetzl et Songzhu, 1998). Ce mécanisme nécessite l'implication de la voie de Ras et des MAPK. La protéine Ras est le point de convergence de la transmission de l'information provenant d'un messenger extracellulaire appartenant à la famille des facteurs de croissance (Blumer and Johnson, 1994) ou encore du LPA. Elle se trouve en amont de la voie des MAP kinases. Celles-ci sont activées par les protéines de la famille G_i (**figure I.18**). Il a été montré que le LPA causait une accumulation de la petite protéine G Ras (Van Corven et al., 1993). Cette protéine

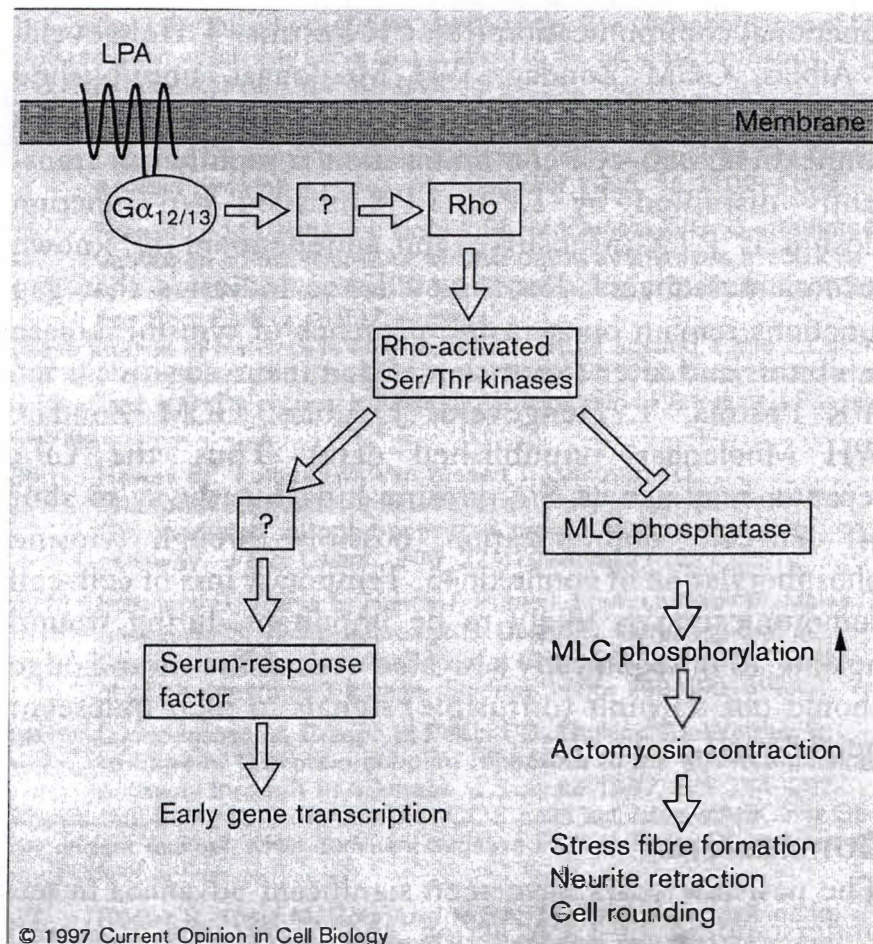


Figure I.19: Schéma hypothétique de l'activation de la voie de Rho après la liaison du LPA à son récepteur, conduisant au réarrangement du cytosquelette (Moolenaar et al., 1997).

	Responses	Cell Types	References
<i>ip_{NA}</i>	Cell rounding	TSM (immortalized neuroblast)	Hecht et al., 1996
		B103 (neuroblastoma)	Fukushima et al., 1998
		B103	Ishii et al., 2000
	AC inhibition	TSM	Hecht et al., 1996
		HTC4 (hepatoma)	An et al., 1998b
		B103	Ishii et al., 2000
	SRE activation	HEK293 (kidney fibroblast)	An et al., 1997b
		B103	Fukushima et al., 1998
	[Ca ²⁺] _i increase	Jurkat T (lymphoma)	An et al., 1998b
		HTC4	An et al., 1998b
	IP production	HTC4	An et al., 1998b
		B103	Ishii et al., 2000
	MAP kinase activation	Yeast (<i>S. cerevisiae</i>)	Erickson et al., 1998
		B103	Ishii et al., 2000
<i>ip_{AA}</i>	Stress-fiber formation	RH7777 (hepatoma)	Fukushima et al., 1998
	BrdU incorporation	B103	Fukushima et al., 1998
	Apoptosis inhibition	Primary Schwann cells	Weiner et al., 1999
	Arachidonic acid release	B103	Ishii et al., 2000
	SRE activation	Jurkat T	An et al., 1998a
	[Ca ²⁺] _i increase	Jurkat T	An et al., 1998b
		HTC4	An et al., 1998b
		Sf9 (insect)	Bandoh et al., 1999
		RH7777	Im et al., 2000b
	IP production	HTC4	An et al., 1998b
		B103	Ishii et al., 2000
	AC inhibition	HTC4	An et al., 1998b
		B103	Ishii et al., 2000
	AC stimulation	Sf9	Bandoh et al., 1999
<i>ip_{AA}</i>	MAP kinase activation	PC12 (pheochromocytoma)	Bandoh et al., 1999
		B103	Ishii et al., 2000
	Cell rounding	B103	Ishii et al., 2000
	Arachidonic acid release	B103	Ishii et al., 2000
	[Ca ²⁺] _i increase	Sf9	Bandoh et al., 1999
		RH7777	Im et al., 2000b
	AC stimulation	Sf9	Bandoh et al., 1999
	AC inhibition	B103	Ishii et al., 2000
	IP production	B103	Ishii et al., 2000
	MAP kinase activation	B103	Ishii et al., 2000
	Arachidonic acid release	B103	Ishii et al., 2000

Tableau I.4: Liste des différents effets médiés par les récepteurs au LPA en culture (Contos et al., 2000)

membranaire a perdu la capacité d'échanger elle-même le GDP contre du GTP, le faisant dès lors à l'aide d'un GEF (guanosine exchange factor) (Pearson et al., 2001). Ras est activée probablement via une kinase. Il pourrait s'agir de la kinase c-src, mais d'autres auteurs évoquent également des récepteurs aux facteurs de croissance tels que le récepteur au EGF (Kranenburg et Moolenaar, 2001). Ras activée déclenche alors par phosphorylations successives, la voie des MAPK avec en aval ERK1 et ERK2 (Robbins et al., 1993). Celles-ci activées, migrent ensuite dans le noyau afin d'activer une série de facteurs de transcription ayant des effets mitogéniques (**figure I.18**).

La petite protéine G Rho

Une conséquence importante au niveau cellulaire de la liaison du LPA à son récepteur, est le réarrangement de l'actine du cytosquelette. Ces modifications du cytosquelette sont connues pour être médiées par la protéine Rho (Goetzl et Songhzu, 1998) dont l'activation peut être induite par la protéine G de type G_{12/13} associée aux récepteurs LPA1 et LPA2.

La façon dont la protéine G active la voie de Rho reste incomprise. L'un des acteurs activés par Rho est une Ser/Thr kinase qui phosphoryle et inhibe la MLC (myosin light chain) phosphatase. De ce fait, la phosphorylation des chaînes légères de myosine augmente, ce qui favorise les contractions du cytosquelette d'acto-myosine.

Cette protéine serait responsable de la rétraction des neurites, de la formation des fibres d'actine de stress et de l'arrondissement de la cellule (Kimura et al., 1996) (**figure I.19**).

La phospholipase C

La PLC est en amont de la PKC et est activée par les protéines G de type G_i et G_q (Moolenaar, 1995). L'activation de la PLC provoque la formation de l'inositol-3-phosphate (IP3) et du DAG à l'origine respectivement d'une augmentation du calcium intracellulaire et de l'activation de la PKC (Jalink et al., 1990). De plus, l'activation de la PKC permet d'activer la PLD responsable de la formation de PA à partir de PC (Van der Bend et al., 1992).

Le système des récepteurs au LPA est donc complexe, par la diversité des récepteurs au LPA, des protéines G associées, des effecteurs régulés et des cascades en aval de ces effecteurs. Nous pouvons donc comprendre que les effets du LPA soient multiples et variables selon les types cellulaires et tissus mis en présence. La diversité de ces réponses est illustrée dans le **tableau I.4**. Mais la biologie du LPA s'est encore compliquée avec la découverte récente de McIntyre et son équipe: le LPA serait également un ligand lipidique naturel à haute affinité pour le facteur nucléaire PPAR γ (McIntyre et al., 2003).

I.3.2 Les récepteurs PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)

C'est en 1990 que les récepteurs activés par les inducteurs de la prolifération des peroxysomes furent découverts par Isseman et Green. Ils mirent en évidence l'isoforme α (PPAR α) et β (PPAR β), cette dernière pouvant encore être nommée δ ou encore NUC-1. En 1999, Devergne et ses collaborateurs identifièrent un troisième récepteur appelé PPAR γ . Leur nom provient du fait que différentes molécules activant PPAR γ augmentaient également le nombre et la taille des peroxysomes dans le foie de rongeurs (Isseman et Green, 1990).

I.3.2.1 Les PPARs et leurs ligands

Ces récepteurs appartiennent à une sous-famille de récepteurs nucléaires qui comprend les récepteurs à l'acide rétinoïque ou encore les récepteurs à l'hormone thyroïdienne. Ce sont des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes cibles en réponse à la liaison de ligands lipophiles (Nishizawa et al., 2001).

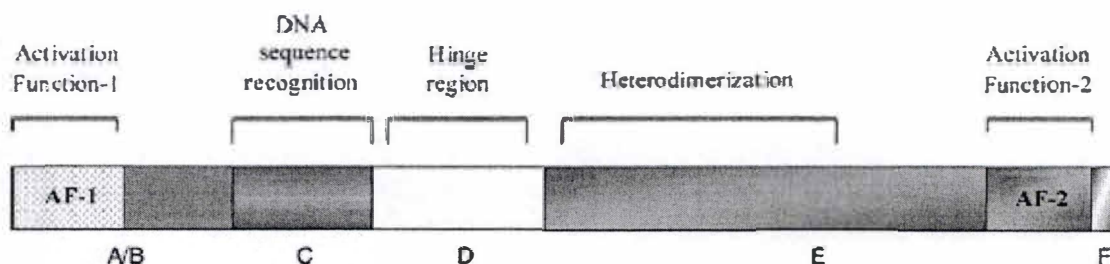


Figure I.20: Représentation des différents domaines présents au niveau des récepteurs PPARs (Blanquart et al., 2003).

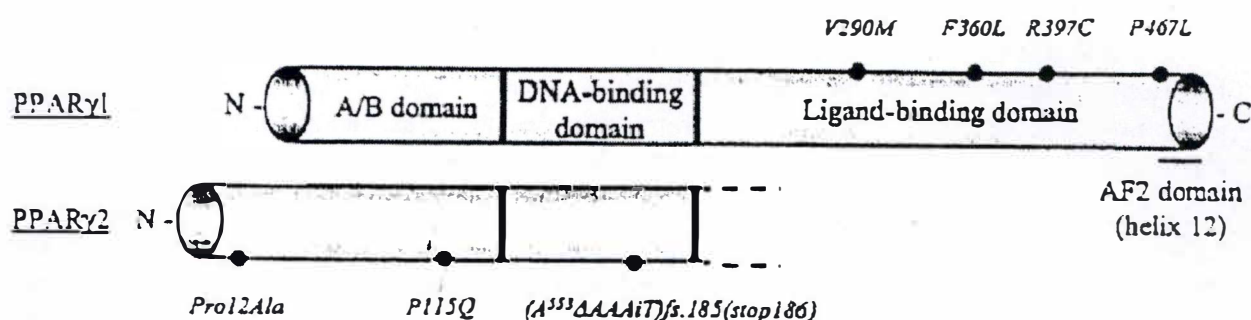


Figure I.21: Représentation des deux isoformes de PPARγ distincts par 28 acides aminés à l'extrémité N-terminale (Gurnell, 2003).

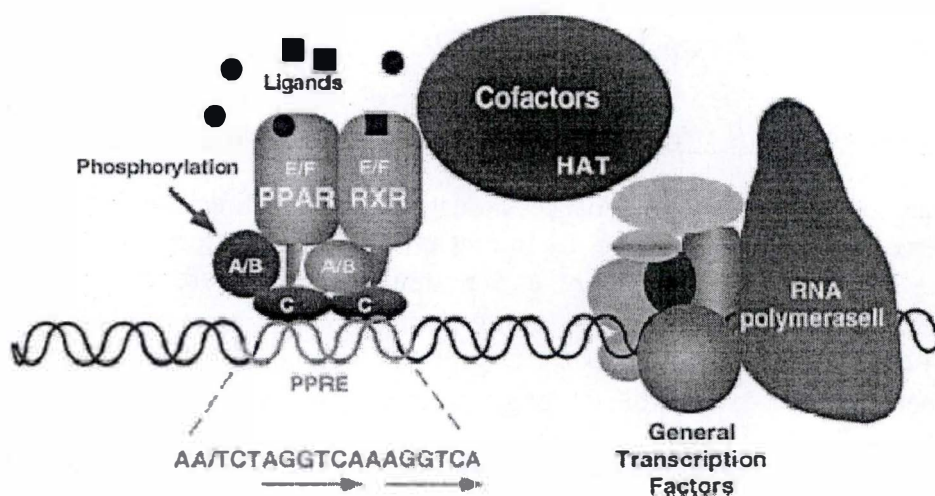


Figure I.22: Représentation de l'activation des récepteurs PPARs et RXR menant à la transactivation des gènes en amont de la séquence consensus PPRE. (Escher and Whali, 1999)

On distingue trois isoformes assez similaires, PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ , encodées par des gènes situés respectivement sur les chromosomes 22, 6 et 3 chez l'homme.

Ils possèdent un domaine A/B N-terminal faiblement conservé ayant une fonction transactivatrice ligand-indépendante (AF-1). L'action des récepteurs peut être régulée suite à des phosphorylations dans ce domaine A/B par certaines MAP kinases comme ERK ou encore JNK (Escher et Whali, 1999). Cette régulation peut être positive comme cela a été vu pour PPAR α ou encore négative en ce qui concerne PPAR γ 2 (Shao et al., 1998) (**figure I.20**).

Ces récepteurs possèdent également un domaine C de liaison à l'ADN (DBD ou DNA binding domain) partageant 85 % de similarité à l'intérieur de la famille (Lemberger et al., 1996).

Un domaine D constitue une extension du domaine DBD C terminal (CTE) ainsi qu'une région charnière reliant le domaine C au domaine E/F (Neve et al., 2000).

Ce domaine E/F comprend un domaine de liaison au ligand (LBD) conservé à 70% et une fonction transactivatrice dépendante du ligand (AF2) (Takano et Komuro, 2001). De plus, le domaine E/F fournit également une surface de dimérisation avec un autre récepteur (Lemberger et al., 1996).

Le transcrit ARN de PPAR γ existe sous trois isoformes issues de l'usage alternatif des trois promoteurs internes au gène. Les isoformes γ 1 et γ 3 sont toutes deux traduites en une même protéine: PPAR γ 1 (Houseknecht et al., 2000). L'isoforme γ 2 quant à elle mène à l'expression de la protéine PPAR γ 2 différant de PPAR γ 1 par 28 acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale (Gurnell, 2003) (**figure I.21**).

Sous une forme non liée au ligand, les PPARs sont inactifs étant donné qu'ils sont liés à un complexe de co-répresseur. La liaison du ligand libère le co-répresseur et recrute un complexe co-activateur (Escher et Whali, 2000). Une fois le ligand fixé à son récepteur, survient un changement de conformation qui permet au récepteur de former un hétérodimère avec le récepteur à l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR) et de se lier ainsi aux éléments de réponse de PPAR (PPRE ou PPAR response element) se situant en amont du gène contrôlé.

PPRE se compose d'une séquence formée par la répétition directe (DR-1) d'un motif hexamérique (AGGTCA) séparé en général par une paire de bases (Vidal, 2002). Le complexe PPAR-RXR peut ensuite recruter toute une série de co-répresseurs (par exemple le Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptor "SMRT") ou de co-activateurs (tels le cAMP response element-binding protein "CREB", le steroid receptor coactivator "SRC-1") (Puigserver et al., 1999). Cette interaction peut être médiée par un autre co-activateur initial (PGC1) comme c'est le cas pour PPAR γ (**figure I.22**).

De façon générale, PPAR α stimule la β - ω oxydation des acides gras en contrôlant l'expression d'enzymes, comme la protéine de transport des acides gras (FATP) ou encore l'acyl CoA synthase. En ce qui concerne PPAR β/δ , il a été montré qu'il joue un rôle dans l'implantation de l'embryon, la prolifération cellulaire et le métabolisme du cholestérol (Kersten et al, 2000).

Pour terminer, PPAR γ dont nous reparlerons plus en détails dans le point I.3.2.3, stimule la différenciation adipocytaire, augmente le stockage des lipides et régule l'expression de gènes du métabolisme lipidique tels que la LPL (lipoprotéine lipase), FATP (fatty acid transporter protein, l'acyl Co synthase et la protéine de liaison des acides gras aP2 (Vidal, 2002). Le PPAR γ joue également un rôle essentiel dans les fonctions du macrophage et en particulier dans la formation de cellules spumeuses (Tontonoz et al., 1998).

Étant donné que le domaine de liaison aux ligands est faiblement conservé, les PPARs ont la capacité de lier de nombreux ligands différents, endogènes ou synthétiques, chacun se caractérisant par une affinité particulière pour un récepteur ou pour les trois récepteurs. Les ligands synthétiques peuvent être classés en diverses catégories dont les inducteurs de la prolifération des péroxysomes, les agents hypolipémiants, certains agents anti-inflammatoires ou encore en des molécules sensibilisant la cellule ou le tissu à l'insuline.

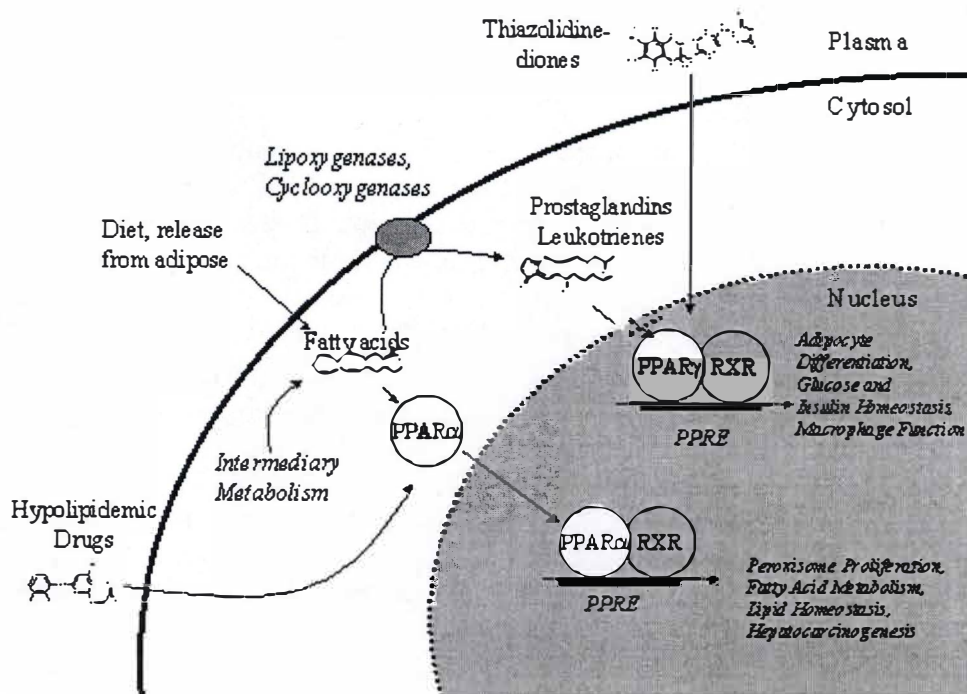


Figure I.23: Schéma illustrant les différents ligands de PPAR α et de PPAR γ (www.cas.psu.edu/.../VET/jackvh/PPAR_Review.htm)

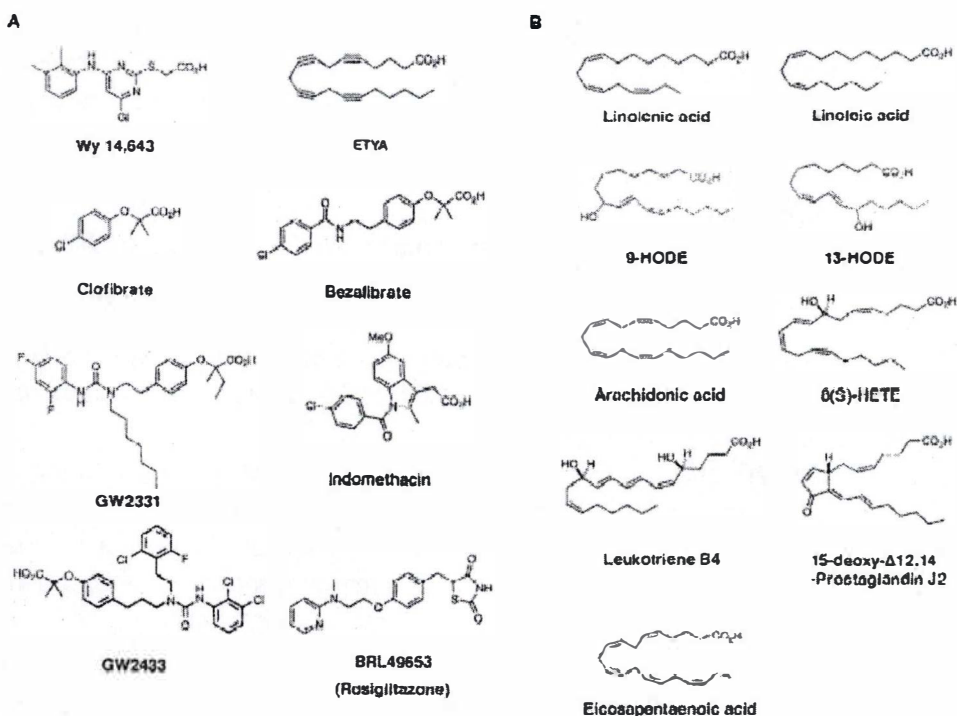


Figure I.24: Représentation de la structure des différents ligands synthétiques (A) ou naturels (B) des PPARs (Escher et Whali, 1999).

Organes/Cellules	PPAR α	PPAR β/δ	PPAR γ	
			PPAR γ 1	PPAR γ 2
Coeur	++	+ (cardiomyocytes)	+ (cardiomyocytes)	/
Cerveau	/	+	+	/
Colon	/	/	+++	/
Foie	++	++ (hepatocytes)	+	/
Intestin	++	/	+	/
Muscles squelettiques	+	/	+	/
Pancréas	++	/	+	/
Peau	/	+	/	/
Placenta	+	/	/	/
Poumons	+	/	+	/
Rate	/	/	+	/
Rein	+	+ (Tubes proximal)	+	/
Tissus adipeux brun	+	+	/	+++
Cellules endothéliales et musculaires lisses	+	/	+	
Macrophages	+	/	/	

Tableau I.5: Distribution tissulaire et cellulaire des différentes isoformes de PPARs.
 +++ = très abondant ++ = moyennement exprimé + = faible abondance

-**PPAR α** a pour ligands les acides gras et leurs dérivés à chaîne insaturée de 10 à 22 carbones, dont les plus affins sont les acides linoléique (LA) et docosahéxaénoïque (DHA) (Yu et al., 1995).

Les dérivés de la voie de la lipoxigénase produits à partir d'acide arachidonique, tels que les éicosanoïdes (acide 8-5- hydroxyéicosatétraénoïque: HETE) et les leukotriènes (LTB₄) ont également été répertoriés comme ligands de PPAR α (Lemberger et al., 1996). Lorsqu'ils sont présents à haute concentration (10 μ M), certains métabolites de la voie de la cyclooxygénase comme les prostaglandines de la série J, A ou D peuvent aussi activer ce récepteur (Yu et al., 1995).

Le premier agent hypolipidémiant décrit en tant que ligand de PPAR α est le WY-14643, appartenant à la classe des fibrates, d'autres molécules suivirent (Clofibrate, bezafibrate, ciprofibrate, fenofibrate) (Escher et Whali, 2000). Il s'agit en fait de molécules induisant l'expression de l'apoprotéine-A1, favorisant la production de HDL (high density lipoprotein) ou "bon cholestérol".

Sont également répertoriés comme ligands de PPAR α , certains médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) comme l'Ibuprofen, le Fenoprofen ou bien encore l'indométhacine (Houseknecht et al., 2000) (**figure I.23**).

-**PPAR γ** est activé par les métabolites dérivés de l'acide arachidonique produits depuis la voie de la cyclooxygénase dont les prostaglandines de la série J (PGJ) qui proviennent de la dégradation non enzymatique des PGD₂. Le métabolite provenant de cette voie et ayant la plus forte affinité est la 15d-PGJ₂ (Lehmann et al., 1995).

Ils peuvent également être activés par des acides gras polyinsaturés à longue chaîne tels l'acide linoléique, l'acide linolénique, l'acide arachidonique. Les métabolites de la voie de la lipoxigénase (par exemple, l'acide 15 hydroxyéicosatétraénoïque ou 15 HETE) produits à partir des acides sont considérés comme ligands de PPAR γ

Certains composants de ox-LDL comme les acide 9 ou 13 hydroxyoctadécadiénoïques (9-ou 13-HODE) ou encore l'hexadécyl-azélaoyl-phosphatidylcholine, peuvent aussi lier et activer ce récepteur (Takano et Komuro, 2001).

Les NSAIDs sont aussi ligands de PPAR γ (Lehmann et al., 1997).

Dans le but de traiter plus efficacement le diabète sucré de type 2 ou diabète insulino-dépendant, une nouvelle classe de molécules fut synthétisée: les thiazolidinédiones (TZD). En 1995, l'équipe de Lehmann démontra qu'elles étaient aussi des ligands à haute affinité pour PPAR γ et au fil des années, leur nombre ne cessa de croître (ciglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, troglitazone, englitazone..) (Lehmann et al., 1995) (**figure I.24**).

-**Les ligands de PPAR β/δ** sont moins connus. Les TZD sont capables d'activer ces récepteurs avec une affinité moindre que celle détectée pour l'isoforme γ . Tout comme PPAR γ , les acides arachidonique, linolénique et linoléique sont capables d'activer également l'isoforme β/δ ainsi qu'un analogue métabolique de l'acide palmitique: l'acide 2-bromopalmitique (Amri et al., 1995).

La distribution des récepteurs PPARs est assez répandue en montrant un taux d'expression différents entre les trois isoformes, tout comme dans le cas des récepteurs membranaires au LPA.

Le **tableau I.5** décrit la distribution tissulaire et cellulaire de ces récepteurs.

I.3.2.2 PPAR γ et LPA

McIntyre et ses collègues (McIntyre et al., 2003) ont récemment identifié le LPA en tant qu'agoniste de l'isoforme γ des PPARs. En effet, suite à des tests de liaison, ils ont découvert

que le LPA pouvait entrer en compétition avec d'autres lipides pour PPAR γ et même déplacer des ligands de haute affinité du récepteur, tels que les TZD. Après avoir mené d'autres tests, ils ont également mis en évidence que l'induction du gène encodant le récepteur scavenger CD36, était déclenchée suite à la liaison du LPA sur PPAR γ . Ce gène est bien connu pour être régulé par le facteur PPAR γ .

De plus, Zhang et ses collègues ont mis en évidence que le LPA et ses analogues induisaient la formation de néointima *in vivo* dans l'artère carotide de rat exposée pendant 60 minutes au LPA (Zhang et al., 2004). Ils observent également une augmentation de l'immuno-réactivité pour le récepteur CD36 au niveau du tissu néo-intimal induit, du moins avec certaines isoformes de LPA. Ils ont observé qu'il existe également une stéréospécificité requise pour induire la formation de la néo-intima.

Ces données récentes suggèrent que le LPA extracellulaire est donc bien capable de traverser la membrane et de se diriger vers le noyau pour activer le facteur PPAR γ et y induire les gènes qu'il contrôle

I.3.2.3 Principales fonctions de PPAR γ

Les PPARs jouent de nombreuses fonctions critiques d'un point de vue physiologique en tant que senseurs lipidiques et régulateurs du métabolisme lipidique. Ils permettraient donc de signaler à la cellule au niveau de l'expression génique, des modifications dans les apports nutritionnels et plus particulièrement dans sa composition lipidique. Comme ce mémoire est centré sur le LPA, ligand des récepteurs au LPA et de PPAR γ , nous nous focaliserons sur les fonctions de PPAR γ . L'isoforme γ des récepteurs PPARs joue de nombreux rôles importants dans différentes fonctions cellulaires tels que l'adipogenèse, la différenciation cellulaire, la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans l'inflammation. Nous allons maintenant parcourir rapidement ces différents processus.

PPAR γ dans l'adipogenèse

L'adipogenèse est le processus de différenciation par lequel passe une cellule préadipocytaire pour devenir un adipocyte (Houseknecht et al., 2000). Cette étape est nécessaire pour permettre le stockage des lipides, elle s'accompagne de l'apparition de marqueurs adipocytaires comme la protéine cytoplasmique de liaison des acides gras (aP2), la leptine, la lipoprotéine lipase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PECK) ou encore l'acyl-CoA synthétase (ACS) (Tontonoz et al., 1995). L'activation de PPAR γ par ses ligands stimule ce processus dans les tissus adipeux blancs et les tissus adipeux bruns, en interagissant avec les éléments en cis des gènes qui régulent l'adipogenèse (Chawla et al., 1994). PPAR γ joue également un rôle essentiel dans la formation des cellules spumeuses à partir de macrophages (Tontonoz et al., 1998). Lehrker et Lazar (2004) ont d'ailleurs récemment souligné la convergence entre la lignée adipocytaire et la lignée monocytaire dans les contextes respectivement de l'obésité et de l'athérosclérose.

PPAR γ dans la pathologie du diabète

Le diabète de type II ou diabète sucré insulino-indépendant (NIDMM) est caractérisé par un taux élevé de glucose sanguin, un dysfonctionnement quant à la production de glucose par le foie et est aussi marqué par une augmentation de l'apoptose des cellules β du pancréas et un manque de sensibilité à l'insuline (De Fronzo, 1988).

Afin de traiter cette pathologie, des molécules améliorant la sensibilité des tissus à l'insuline furent mises au point: les TZD. Il s'agit précisément de ligands de PPAR γ (Mital et al., 2002).

L'activation de PPAR γ par ces ligands permet d'augmenter l'expression de protéines appartenant à la voie de signalisation de l'insuline et donc d'augmenter la sensibilité des tissus à celle-ci (Capeau, 2003). Enfin, certains auteurs pensent que les TZD pourraient exercer leurs effets via PPAR γ par la sécrétion de molécules encore non identifiées qui moduleraient la sensibilité des organes à l'insuline (Lemberger et al., 1996).

PPAR γ et la régulation du cycle cellulaire

Un autre aspect intéressant de l'activation des récepteurs PPAR γ d'un point de vue thérapeutique, est la régulation négative de la prolifération des cellules musculaires lisses du système vasculaire (Berger et Moller, 2002).

L'activation des PPAR γ permettrait également d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses telles que celles des adénocarcinomes, des liposarcomes (Tontonoz et al., 1997) et de les différencier en des formes moins virulentes. La différenciation implique également la cessation de la croissance. (Altioek et al., 1997).

PPAR γ dans la pathologie de l'athérosclérose et l'inflammation

Comme déjà mentionné, l'athérosclérose se caractérise par des lésions qui passent par: la strie lipidique, la plaque fibreuse et la plaque d'athérome (Ross, 1993). Diverses études ont montré que la liaison des ligands de l'isoforme γ des PPARs médiait l'avancement de la pathologie à chacune de ces étapes (Berger et Moller, 2002). Mais il y a toujours une controverse sur les effets anti- ou pro- athérogènes de PPAR γ . Il s'agit d'un problème complexe qui dépasse le cadre de ce mémoire. Néanmoins, en guise d'illustration, nous évoquerons quelques effets plutôt pro-athérogènes et ensuite des effets plutôt anti-athérogènes attribués au PPAR γ .

Effets pro-athérogènes

L'étape précoce de l'athérosclérose concerne la perte de l'intégrité de l'endothélium et donc l'entrée des composants du plasma (Marx, 2002). L'endothélium activé exprime alors des molécules d'adhérence (V-CAM, I-CAM, E-sélectine), ainsi que des chémokines qui de manière concertées recrutent et immobilisent les leucocytes circulants (monocytes, lymphocytes T) (Barter et al., 2002). L'expression de PPAR γ est quasi absente dans les monocytes (Wakino et al., 2001), augmente lors de la différenciation en macrophage (Chinetti et al., 2000) et joue un rôle important dans la formation des cellules spumeuses. En effet, certains dérivés lipidiques des ox-LDL, dont le LPA, activent PPAR γ au niveau des macrophages et provoquent la transcription et donc l'expression du récepteur scavenger CD36 (Han et al., 2000). Pour rappel, ce récepteur est responsable de l'incorporation des ox-LDL à l'intérieur des macrophages et également des cellules musculaires lisses (Stevens et Lowe, 1997). L'incorporation des ox-LDL est donc augmentée par un mécanisme de feed-back positif. Sur base de ces observations, l'effet de l'activation de PPAR γ peut être considéré comme plutôt pro-athérogène (Febbraio et al., 2000).

Effets anti-athérogènes

Les effets anti-inflammatoires des agonistes de PPAR γ ont été décrits par plusieurs auteurs. Il a été mis en évidence que les ligands de PPAR γ pouvaient inhiber l'expression de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α ainsi que celle des molécules d'adhérence telles que V-CAM, I-CAM ou bien encore des chémokines comme MCP-1 (Marx et al., 2002). Ils bloquent également l'expression d'une monokine endothéliale de 10 KDa induite par l'interféron γ (IFN γ) et de la chémokine α -chémottractrice induite également par l'IFN γ .

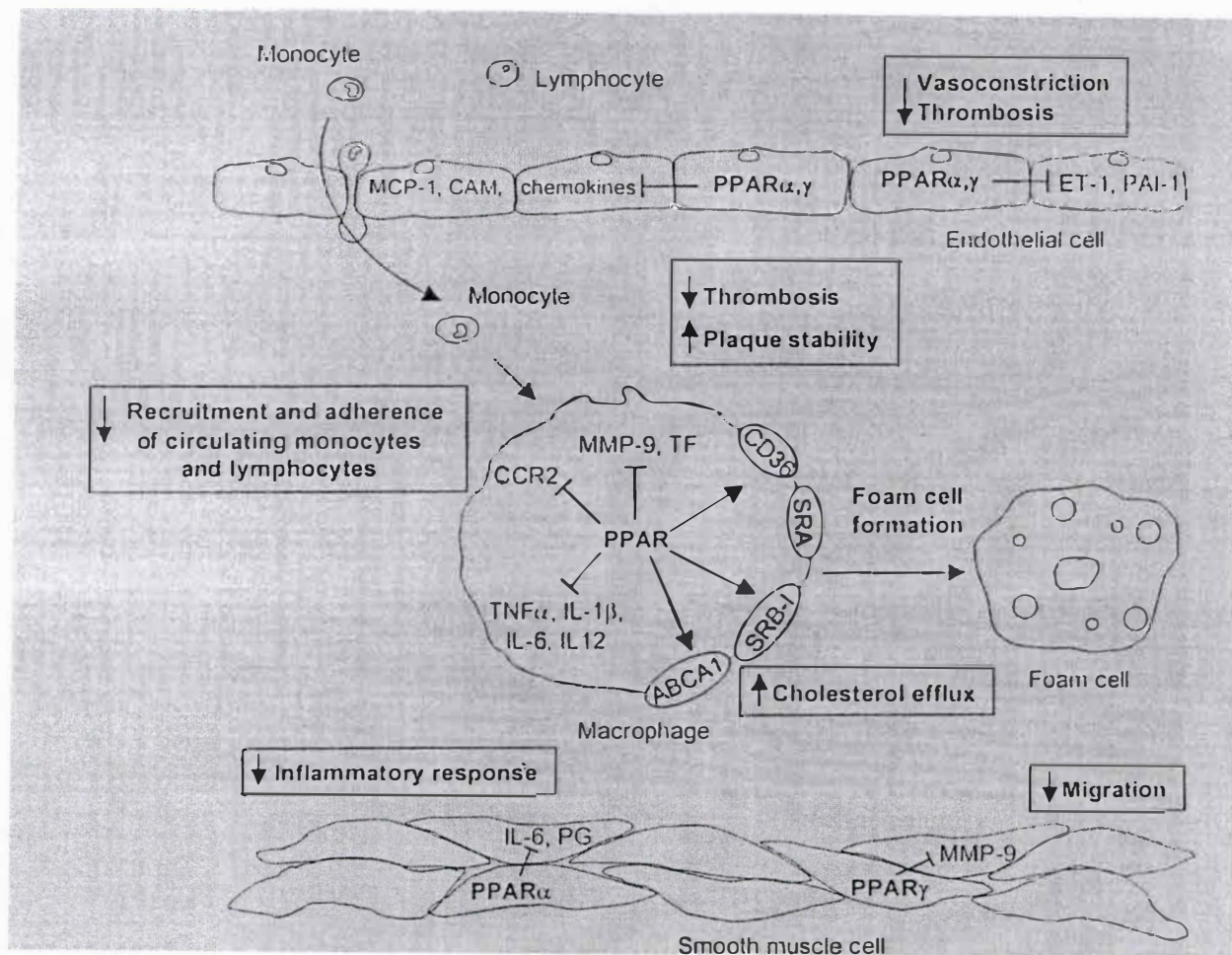


Figure I.25: Schéma illustrant les effets globalement anti-athérogènes de l'activation de PPAR γ sur différents types cellulaires (Marx, 2001).

exprimée par les lymphocytes T et servant à leur recrutement (Marx et al., 2002) (**figure I.25**). Cette propriété peut être expliquée par l'interaction "négative" de PPAR γ avec les facteurs de transcription AP-1, STAT ou encore NF κ B (Jiang et al., 1998).

La migration des cellules musculaires lisses vers l'intima dépend notamment de la dégradation de la matrice extracellulaire par la métalloprotéinase 9 sécrétée (MMP-9) (Marx, 2002). Les activateurs des PPAR γ inhibent également l'expression de cette enzyme (Marx et al., 1998) et empêcheraient de la sorte la migration des cellules musculaires lisses, diminuant ainsi le risque de formation d'une plaque instable (Marx et al., 1998). Cette inhibition se fait via la régulation transcriptionnelle négative du facteur Ets, qui à son tour régule la transcription du gène de la MMP-9 (Barbier et al., 2002).

La migration peut également être induite par l'expression dans les lésions athérosclérotiques d'un vasoconstricteur mitogénique, l'endothéline 1 (ET-1) (Delerive et al., 1999). Son expression peut être augmentée par diverses molécules comme le TNF- α , la thrombine ou encore les ox-LDL (Xie et al., 1999). Les activateurs de PPAR γ régulent de manière négative cette expression en interférant avec le facteur de transcription AP-1.

Enfin, un autre effet des activateurs de PPAR γ serait d'augmenter l'expression de la lipoprotéine lipase dans les adipocytes, permettant dès lors de diminuer les lipides circulants par lipolyse (Way et al., 2001). Ils induiraient également la clearance des lipoprotéines riches en triglycérides.

Tous ces exemples appuient l'hypothèse de certains auteurs selon laquelle l'activation de PPAR γ aurait globalement des effets bénéfiques sur le développement de l'athérosclérose malgré l'induction du récepteur scavenger CD36 (Pilon et al., 2002).

II. Matériels et méthodes

Milieu Stock	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu DHG (DMEM High Glucose 4,5 g/l) (Invitrogen, USA) - Antibiotiques : Pénicilline 0,5 µg/ml, Streptomycine 50 µg/ml (Gibco, Royaume-Uni)
Milieu Complet	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu Stock - 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Royaume –Uni)

Tableau II.1: Composition des milieux utilisés pour la culture des cellules EAhy926

II.1 Culture des cellules endothéliales EAhy926 et épithéliales Hela

La lignée cellulaire EAhy926 a été utilisée au cours de ce travail. Il s'agit d'une lignée permanente obtenue à partir de la fusion entre des cellules HUVEC, lignée primaire de cellules endothéliales humaines de veine ombilicale et des cellules non endothéliales de la lignée permanente A549/8, elles-mêmes issues d'un carcinome de poumon. Cette lignée a pour caractéristiques de pouvoir effectuer plus d'une centaine de passages en culture et d'exprimer le facteur de Von Willebrand propre aux cellules endothéliales (Edgell et al., 1983). Cette lignée cellulaire nous a été généreusement donnée par le Docteur Cora-Jean S. Edgell de l'Université de Caroline du Nord (USA).

Nous avons également utilisé les cellules HeLa, il s'agit de cellules épithéliales prélevées sur une patiente lors d'une biopsie cervicale. C'est le nom de cette patiente qui a servi à nommer ces cellules: Henriette Lack.

II.1.1 Matériels

- Cellules EAhy926 (fournies par Cora-Jean S. Edgell de l'université de Caroline du Nord, USA)
- Cellules Hela (ATCC, CCL-13, Royaume-Uni)
- PBS (NaCl 0,9 %, KH₂PO₄/ K₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4)
- Solution stérile de trypsine 0,05 % - EDTA 0,53 mM (Gilco BRL, Royaume-Uni)
- Boîtes de culture de 25 cm² (T25) ou 75 cm² (T75) (Costar, USA)
- Boîtes multi puits de 12 ou 24 puits (Costar, USA)
- Milieux de culture (**Tableau II.1**)
- Chambre de Neubauer (Marienfeld, Belgique)
- Solution de Bleu de trypan 4 % à préparer dans 0,81 % de NaCl et 0,06 % de phosphate de potassium (Sigma, USA)
- Centrifugeuse (Universal Hettich, Allemagne)
- Tubes de 10 ml (Becton Dickinson, Royaume-Uni)
- Tubes de 50 ml (Sarstedt, Allemagne)

II.1.2 Méthodes

II.1.2.1 Repiquage

EAhy926

Les cellules sont maintenues en culture dans des boîtes de 75 cm² (T75) contenant 15 ml de milieu complet (**Tableau II.1**). La culture se déroule dans une atmosphère maintenue à 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité au sein d'une étuve à 37° C. La confluence est atteinte quelques jours plus tard et correspond approximativement à 133.333 cellules par cm² et donc un total de dix millions de cellules par T75. C'est à ce moment qu'elles devront être repiquées selon le protocole suivant.

Après avoir décanté le milieu de culture, les cellules sont rincées deux fois dans 10 ml de PBS stérile pour éliminer toute trace de sérum. 1 ml de trypsine + EDTA est ensuite ajouté aux cellules pour une incubation de 1 à 2 minutes à 37° C. Celle-ci aura pour action de détacher les cellules de leur support. Afin de neutraliser les effets de la trypsine, 9 ml de milieu complet sont ajoutés à la suspension cellulaire. C'est à ce moment qu'un comptage cellulaire peut être effectué sur cette suspension à l'aide d'une chambre de Neubauer (voir II.1.2.2). Le reste de la suspension est alors transvasé dans un tube afin d'être centrifugé 7 minutes à 1000 RPM. Après avoir resuspendu le culot dans un certain volume de milieu complet, une dilution 1:2 ou 1:3 est effectuée permettant d'atteindre la confluence environ 2 à 3 jours plus tard.

Stimulation	Concentration Stock	Concentration Finale	Type de molécule
TNF α	10 μ g/ml	1 μ g/ml	Cytokine pro-inflammatoire Activation de IKK et donc libération de p50-65 qui a un effet transactivateur sur pNF κ B-Luc
db AMPc	30 mM	0,3 mM	Augmente la concentration intracellulaire en AMPc qui active la voie de la PKA en amont de CRE et cause la transactivation de pCRE-Luc
Rosiglitazone	10 mM	10 μ M	Agoniste de PPAR γ Effet transactivateur sur PPRE-Luc
PMA +	0,1 μ g/ml	Soit 0,02 μ g/ml Soit 0,01 μ g/ml	Activateur de la PKC
Ionomycine	1 mM	Soit 0,1 mM Soit 0,2 mM	Transporteur de Ca ⁺⁺ Activateur de AP1
VEGF	1 mg/ml	20 ng/ml	Facteur angiogénique Activateur de AP1

Tableau II.2: Liste des différentes molécules utilisées lors des stimulations, ainsi que leur concentration finale et leur effet attendu.

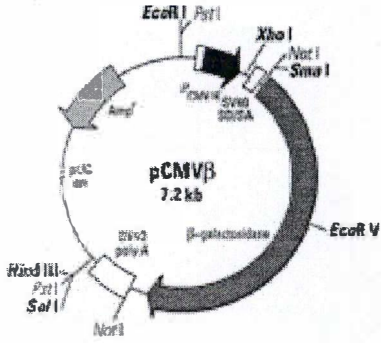
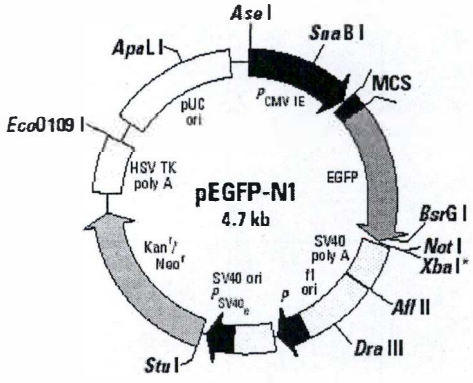
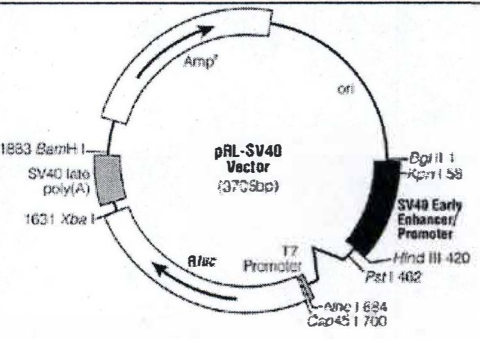
Plasmides	Promoteur	Taille	Caractéristiques
 <p>pCMVβ 7.2 kb</p>	Fort CMV Cytomégalo virus	7,2 Kb	<ul style="list-style-type: none"> - β-galactosidase de E.coli - Gène de résistance à l'ampicilline - Origine de réplication bactérienne, pUC ori
 <p>pEGFP-N1 4.7 kb</p>	Fort CMV	4,7 Kb	<ul style="list-style-type: none"> - Green Fluorescent protein mutée au niveau du chromophore (EGFP) - Résistance à la kanamycine, néomycine - Origine de réplication bactérienne, pUC 19 - Origine de réplication eucaryote, SV40 ori - Site multiple de clonage
 <p>pRL-SV40 Vector (3759bp)</p>	Fort SV40	3,7 Kb	<ul style="list-style-type: none"> - Luciférase Renilla - Résistance à l'ampicilline

Tableau II.3: Description et représentation schématique des différents plasmides utilisés

Plasmides	Promoteur	Taille	Gènes contenus
	<p>TATA Box + des éléments enhancers inductibles dépendants du facteur de transcription étudié:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pAP1-Luc: AP1 7X - pNFκB-LUC: NFκB 5X - pCRE-Luc: CRE 4 	5,6 Kb	<ul style="list-style-type: none"> - Luciférase Firefly - Résistance à l'ampicilline - Origine de réplication bactérienne, col E1 Ori
	Fort CMV		
	Fort CMV	2,8Kb	<ul style="list-style-type: none"> - Site multiple de clonage - Résistance à l'ampicilline - Origine de réplication bactérienne, pUC ORI - Tag hautement immunoréactif Myc

Tableau II.3 suite; Description et représentation schématique des différents plasmides utilisés

HeLa

La culture cellulaire des HeLa ne diffère pas de celle des EAhy926, les milieux repris au **tableau II.1** sont également utilisés. Toutefois, la densité cellulaire des HeLa à confluence est de 250.000 cellules par cm^2 et les cellules sont repiquées de façon régulière tous les trois jours suivant une dilution 1:4.

II.1.2.2 Comptage des cellules

Un petit volume de suspension cellulaire est prélevé lors du repiquage et dilué 1:2 dans du bleu de trypan, permettant ainsi de distinguer les cellules mortes des vivantes. Un certain volume de cette solution sera alors déposé dans la chambre de Neubauer afin de réaliser un comptage. Ce dernier nous permettra d'estimer la densité cellulaire dans la suspension et donc le nombre de cellules contenues dans la T75 initiale.

II.1.2.3 Stimulation des cellules

Avant d'être stimulées, les cellules sont rincées avec du PBS, le temps de stimulation diffère suivant le protocole utilisé (voir résultats). Les différentes molécules de stimulation ainsi que leur concentration stock, finale et leur effet attendu sont décrits dans le **tableau II.2**

II.2 Gestion des plasmides

II.2.1 Description des plasmides utilisés

II.2.1.1 pCMV β (Clontech, USA)

Ce plasmide (**tableau II.3**) a été utilisé dans le but de quantifier l'efficacité de transfection lors des premières expériences de mises au point en mesurant l'activité β -galactosidase de la cellule. Cette efficacité peut être évaluée à partir d'un test colorimétrique ou histochimique détaillé au point II.3.2.1

II.2.1.2 pEGFP- N1 (Clontech, USA)

Ce plasmide (**tableau II.3**) a également été utilisé dans le but de quantifier l'efficacité de transfection lors des mises au point de transfections triples. L'utilisation d'un simple microscope ou du système Agilent décrit au point II.3.2.2, permet d'estimer de façon visuelle ou quantitative la EGFP exprimée dans les cellules.

II.2.1.3 PathDetect signal transduction pathway cis-Reporting System (Stratagene,USA)

Ce système permet de mettre en évidence l'implication de différents facteurs de transcription suite à nos conditions expérimentales grâce aux éléments enhanceur spécifiquement inducibles que possèdent ces différents plasmides au sein de leur promoteur. Ces éléments enhanceur consistent en des répétitions de séquences consensus soit du cyclic AMP response element dans pCRE-Luc, soit du site de liaison de NF κ B dans pNF κ B-Luc, du site de liaison de AP1 dans pAP1-Luc ou bien de PPAR dans PPRE-Luc. Ce dernier a été employé afin de déterminer si le LPA possédait un effet transactivateur au niveau de la séquence consensus PPRE. Sous contrôle de ce promoteur particulier, chacun de ces plasmides possède de plus le gène rapporteur de la luciférase firefly. Ce système comporte également un plasmide d'expression pouvant servir de contrôle positif (pFC-MEKK). Il code pour une MEK kinase placée sous contrôle d'un promoteur fort. Une fois transfectée avec ce plasmide, la cellule

Tampon de resuspension P1	<ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 50 mM pH 8,0 - EDTA 10 mM - 100 µg / ml de RNaseA
Tampon de lyse P2	<ul style="list-style-type: none"> - NaOH 200 mM - SDS 1 %
Tampon de neutralisation P3	<ul style="list-style-type: none"> - Acétate de potassium 3M, pH 5,5
Tampon d'équilibration des colonnes QBT	<ul style="list-style-type: none"> - NaCl 750 mM - MOPS 50 mM pH 7,0 - Isopropanol à 15 % - Triton X-100 à 0,15 %
Tampon de lavage QC	<ul style="list-style-type: none"> - 1 M NaCl - 50 mM MOPS, pH 7,0 - Isopropanol à 15 %
Tampon d'élution QF	<ul style="list-style-type: none"> - 1,25 M NaCl - Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 - Isopropanol à 15 %

Tableaux II.4 Composition des différents tampons du kit Qiagen

exprime ce partenaire de la voie des MAPK se trouvant en amont de l'activation des différents facteurs de transcription étudiés. (tableau II.3 suite)

II.2.1.4 pRL-SV40 (Promega, USA)

Codant pour une luciférase de type "Renilla" (tableau II.3), ce plasmide permet de normaliser l'activité luciférase "Firefly" des plasmides inductibles utilisés. La méthode de révélation est celle décrite au point II.3.2.3

II.2.1.5 pCMV-Myc (Clontech, USA)

Nous avons utilisé ce plasmide (tableau II.3) afin d'envisager plus tard, l'insertion de mutants dominants négatifs grâce à la présence d'un site multiple de clonage.

II.2.2 Production des plasmides

La maxi préparation permet de purifier de grandes quantités d'ADN plasmidique. Une première étape consiste à rendre les bactéries compétentes, c'est-à-dire à les rendre perméables aux molécules d'ADN. Une fois compétentes les bactéries peuvent être congelées à -70°C . La transformation bactérienne se fait par choc thermique, les bactéries sont mises en présence des molécules d'ADN d'intérêt pendant 20 minutes sur glace puis sont déposées 2 minutes à 42°C favorisant ainsi l'ouverture des pores et donc l'entrée de l'ADN. Les cellules bactériennes transformées sont alors amplifiées et l'ADN d'intérêt récupéré au moyen d'une colonne échangeuse d'anions sur laquelle s'adsorbe l'ADN plasmidique, les autres composants bactériens étant élués. L'ADN est ensuite quantifié et une fraction de celui-ci est restreinte afin de vérifier que le profil de restriction est bien correct.

II.2.2.1 Matériels

- Bactoagar 20 g/l (Becton Dickinson, USA)
- LB 20 g/l (Becton Dickinson, USA)
- Ampicilline stock 50 mg/ml à diluer 500X (Sigma, USA)
- Kanamycine stock 10 mg/ml à diluer 200X (Sigma, USA)
- Inoculateur stérile
- Maxi Kit 500 (Qiagen, Allemagne)
- - Tampon (tableau II.4)
- Gel d'agarose 0.8 %
 - 0.64 g d'agarose (Invitrogen, Royaume-Uni)
 - 80 ml de TBE (Invitrogen, Royaume-Uni)
 - 15 μl de bromure d'éthidium (Sigma, USA)
- Tampon de charge 6X (Promega, USA)
- Étalon de poids moléculaire 1Kd (Promega, USA)
- GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotechnologie, Royaume-Uni)
- Centrifugeuse (Heraeus, Biofuge 17RS, Allemagne)
- Chambre d'incubation et d'agitation (Innova 4300, New brunswick Scientific, USA)

II.2.2.2 Méthode

A. Amplification des plasmides

Pour amplifier certains plasmides comme pEGFP-N1, nous utilisons des bactéries XL1 blue et non les SURE qui sont naturellement résistantes à la kanamycine.

Les milieux agar et LB sont préparés à l'avance. L'antibiotique est ajouté à l'agar qui est ensuite versé rapidement dans des boîtes de pétri. Toutes les opérations se font à côté du bec Bunsen pour éviter toute contamination.

Plasmides	Enzymes Utilisées	Nombre de restriction attendues	Taille des bandes attendues
pRL-SV40	HIND III	1	3,7 Kb
	HIND III et	1	1,463 Kb
	BAMH I	1	2,242 Kb
pCMV-Myc	ECOR I	1	3,8 Kb
	PST I	2	2,66 Kb et 1,13 Kb
pPPRE-Luc	Nar I	1	6,8 Kb
pAP1-Luc	Sma I	1	5,653 Kb
	ECOR I	2	622 pb 5,06 Kb
pEGFP-N1	Sma I	1	4,7 Kb
	PVU II	2	600 pb 4,100 Kb

Tableau II.5 : Liste des enzymes utilisées pour restreindre les différents plasmides et taille attendue pour chacune des restrictions effectuées.

Grâce à un inoculateur, on récupère une faible fraction des bactéries transformées et stockées à -70°C qui est ensuite déposée en fines stries sur des boîtes de pétri. L'incubation dure une nuit à 37°C .

À l'aide d'un tips, on récolte une colonie isolée des boîtes de pétri que l'on dépose dans un tube contenant 2 ml de milieu LB et l'antibiotique approprié. Celui-ci est alors incubé une nuit à 37°C et sous une agitation de 250 RPM.

Le contenu du tube est alors mélangé à 150 ml de milieu LB + antibiotique approprié et mis sous une agitation de 250 RPM à 37°C pendant une nuit.

Les cultures liquides sont centrifugées 15 minutes à 6000 RPM et 4°C . Après avoir jeté délicatement le surnageant, le culot est resuspendu dans 10 ml de tampon P1. On rajoute ensuite 10 ml de tampon P2 que l'on mélange par inversion 4 à 6 fois afin de lyser les cellules. Après une incubation de 5 minutes, on ajoute 10 ml de solution P3 pour neutraliser la lyse alcaline. De nouveau quelques inversions sont effectuées avant de placer les tubes sur glace pendant au moins 20 minutes. Ils sont ensuite centrifugés une fois 20 minutes et une seconde fois 15 minutes à 20.000 g et 4°C . Pendant ce temps, les colonnes fournies dans le kit sont équilibrées avec 10 ml de tampon QBT. On dépose enfin le surnageant sur les colonnes qui filtrent alors celui-ci et retiennent l'ADN plasmidique.

Ensuite, 2 x 30 ml de tampon QC sont déposés pour éluer tout ce qui est aspécifique. Les colonnes sont par après placées sur des tubes Corex et l'ADN est élué avec 15 ml de solution QF. Il est alors précipité par 10,5 ml d'isopropanol et par centrifugation pendant 30 minutes à 15.000 g et 4°C . Le surnageant est décanté délicatement et le culot lavé avec 5 ml d'éthanol à 70 % avant d'être à nouveau centrifugé à 15.000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est enlevé et le culot séché à l'air, puis resuspendu dans 300 μl d'eau stérile. Les solutions de plasmides sont conservées à -20°C .

B. Quantification de l'ADN

L'ADN extrait est quantifié par spectrophotométrie U.V. L'absorbance des échantillons est mesurée pour deux longueurs d'ondes. L'absorbance à 260 nm quantifie l'ADN tandis que celle à 280 nm la quantité de protéines. C'est le ratio entre l'absorbance à 260 nm / 280 nm qui détermine la pureté de l'échantillon.

C. Restriction enzymatique

Afin de vérifier le profil de restriction des plasmides amplifiés, nous utilisons des endonucléases qui reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN double brin et le coupent à cet endroit. (**tableau II.5**). Les produits de la restriction sont séparés par électrophorèse d'agarose et comparés à un marqueur de taille connue. Les enzymes utilisées pour les différents plasmides sont décrites au **tableau II.5**. Concrètement, 0,5 μl d'ADN sont mélangés à 0,5 μl d'enzyme et 2,5 μl de tampon correspondant à l'enzyme (aux enzymes). Le volume est ensuite porté à 25 μl avec de l'eau, la réaction de restriction se déroule pendant environ 2 h à 37°C . Le gel d'agarose est alors préparé. Après polymérisation, celui-ci est placé dans la cuve remplie de tampon d'électrophorèse (TBE 1 X). Une fois la restriction finie, 5 μl de tampon de charge sont ajoutés aux différents échantillons. De ceux-ci, 10 μl sont déposés dans les puits et 10 μl d'étalon de poids moléculaire sont déposés dans un puit. La migration est réalisée sous un voltage de 100 V pendant 45 minutes. Le gel est alors photographié sous U.V.

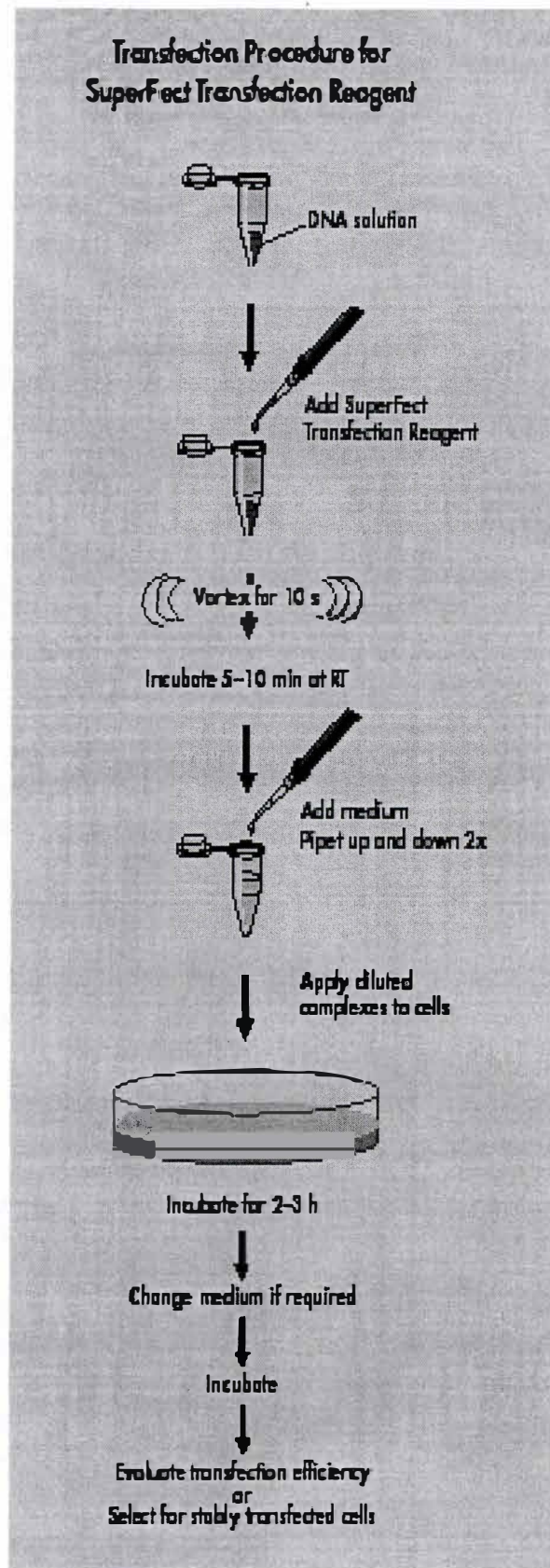


Figure II.1: Protocole de transfection utilisant le superfect (d'après le manuel d'utilisation fourni par Qiagen). Lors de nos transfections, nous ne procédons pas à l'agitation pour la formation des complexes ADN-Sf.

Milieu Stock	- Milieu DHG (DMEM High Glucose) (Invitrogen,USA)
Milieu Complet	- Milieu Stock - 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Royaume- Uni)
Milieu de transfection	- Optimen (Invitrogen,USA) - 5 % de sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Royaume-Uni)

Tableau II.6: Composition des milieux de culture des cellules EAhy926.

II.3 Transfection des cellules EAhy926 et modes de révélation

La transfection est une technique qui consiste à incorporer du matériel génétique exogène en vue de l'expression de celui-ci dans des cellules eucaryotes. Tout au long de ce travail, nous allons mettre au point cette technique sur un modèle de cellules endothéliales, réputées récalcitrantes à la transfection. Pour ce faire, nous jouerons sur les paramètres de transfection tout comme sur le choix d'un agent de transfection. Notre but étant d'observer l'effet du LPA sur des cellules ayant incorporé un plasmide contenant la séquence consensus du facteur de transcription PPAR γ .

II.3.1 Transfection utilisant le Superfect

Le superfect (Sf) est un dendrimère de forme sphérique possédant des branchements radiaires partant du cœur de la structure et se terminant par des groupements aminés. Étant chargé positivement, il interagit avec l'ADN et la membrane chargés négativement et permet ainsi l'incorporation du complexe ADN-Superfect dans la cellule. Cet agent permet de procéder de façon rapide, reproductible et ce sur plusieurs types de cellules (**figure II.1**).

II.3.1.1 Matériels

- Boîtes multi puits de 12 ou 24 puits (Costar, USA)
- Plasmides (**tableau II.3**)
- Superfect 3 mg/ml (Qiagen, Allemagne)
- Optimem (Invitrogen, USA)
- Milieux de culture (**tableau II.6**)
- PBS: (NaCl 0,9 %, KH₂PO₄/ K₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4)
- Sérum de veau foetal (FBS)

II.3.1.2 Méthode

Les cellules sontensemencées en plaques 12 puits à raison de 100.000 ou 125.000 cellules par puits la veille dans un milieu de culture ne contenant pas d'antibiotiques afin de ne pas influencer sur la transfection. Les cellules se trouveront donc dans un état de préconfluence pour la transfection. Les différents plasmides sont préalablement dilués dans de l'Optimem afin d'atteindre les proportions adéquates (volume final de 120 μ l par puits). Après cinq minutes, le Sf est ajouté pour un temps de complexation de quinze minutes à température ambiante. Le volume de Sf ajouté dépend du ratio utilisé. Pendant ce temps, les cellules sont rincées une fois au PBS. À la fin de l'incubation, de l'Optimem + FBS est ajouté à raison de 700 μ l par puits. Le pourcentage en sérum de ce milieu est adapté afin d'obtenir une solution finale à 5% de sérum. Enfin, 800 μ l de ce mélange sont déposés dans chaque puits. Les cellules restent alors en contact avec les complexes ADN-Sf durant 3 heures à 37° C, 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité. Les cellules seront ensuite rincées avec du DHG seul avant d'être placées pour un temps défini dans un milieu de récupération.

II.3.2 Transfection utilisant la Lipofectine

La lipofectine est un lipide cationique composé de dioléyl-oxy-propyl-triméthylammonium (DOTMA) et de dioléyl-oxy-phosphatidyléthanolamine (DOPE) qui assure la stabilisation du complexe lipide-ADN et augmente la probabilité de fusion entre membranes cellulaires et les lipides cationiques. De nouveau, une fois le complexe rentré à l'intérieur de la cellule, on ne connaît pas encore bien les mécanismes par lesquels l'ADN plasmidique se défait du complexe et migre vers le noyau.

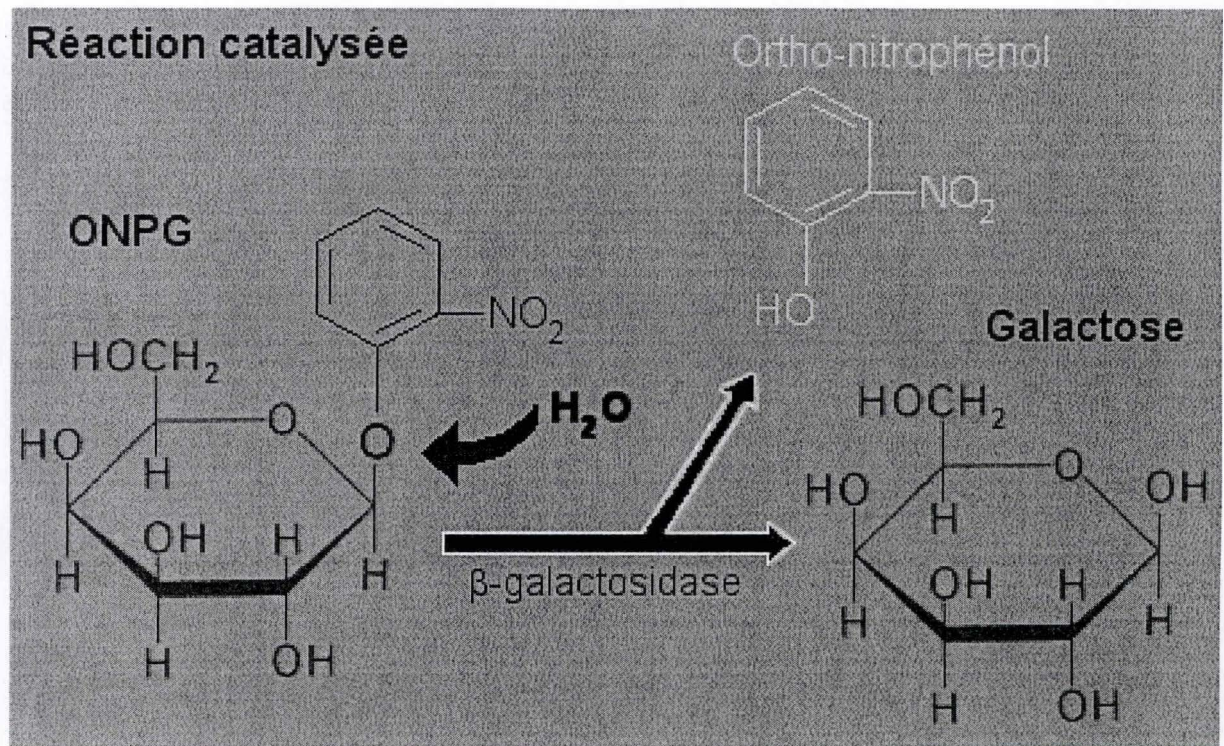


Figure II.2: Schéma présentant la réaction catalysée par la β -galactosidase. La β -galactosidase catalyse l'hydrolyse de l'ONPG (2-O-nitrophényl- β -D-galactopyranoside) et libère un produit, l'ortho-nitrophénol dont l'absorbance peut être mesurée à 405 nm ainsi que du galactose.

II.3.2.1 Matériels

- Lipofectine 1 mg/ml (Invitrogen, USA)

Mis à part l'agent de transfection, le matériel utilisé est identique à celui du point II.3.1.1

II.3.2.2 Méthodes

Comme pour le Superfect, les cellules sont repiquées la veille dans un milieu ne contenant pas d'antibiotiques et de façon à atteindre la préconfluence le jour de la transfection. Parallèlement, les concentrations nécessaires d'ADN et de Lipofectine vont être déposées dans l'Optimem (100µl/puits). Après cinq minutes d'incubation, les 2 volumes sont mélangés afin de former les complexes ADN-Lipofectine durant 20 minutes. Pendant ce temps, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis un volume de 100µl d'Optimem + FBS sont déposés dans chaque puits. Le pourcentage en sérum de ce milieu est adapté afin d'obtenir une solution finale de 5% sérum. Ensuite, 200 µl de complexe sont dispensés dans chaque puits avant de les replacer à l'étuve pour 4 heures. Les cellules subissent par après un traitement semblable à celui subit lors d'une transfection au Sf.

II.3.2 Modes de révélation

II.3.2.1 Révélation de l'activité β -galactosidase

Après une transfection utilisant le plasmide pCMV β , nous estimons l'efficacité de transfection en évaluant l'activité β -galactosidase. En effet, ce plasmide contient le gène Lac de E.coli, codant pour la β -galactosidase, enzyme catalysant l'hydrolyse des sucres β -galactosides en lactose. La révélation peut se faire suivant deux méthodes.

A. Révélation colorimétrique:

Elle permet de doser l'activité β -galactosidase dans le lysat cellulaire en utilisant comme substrat l'ONPG (2-O-nitrophényl- β -D-galactopyranoside). La réaction enzymatique libère un composé qui se colore en jaune et absorbe à 405 nm. L'utilisation d'un photomètre permet alors de quantifier la production de ce composé et donc l'activité β -galactosidase du lysat. (figure II.2)

A.1 Matériels

- Plaques 96 puits (Greiner bio-one, Allemagne)
- PBS: NaCl 0,9 %, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, pH 7,4
- Tampon de lyse M-PER: Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce, USA)
- Lecteur de plaques (Microplate Imaging System, Biorad, USA)
- Vortex Rotatif (Schüttler MTS2, IKA Laboratories, Allemagne)
- Substrat pour le dosage de l'activité:
 - Tampon PBS
 - 2-Mercaptoéthanol 100 mM (Fluka, Suisse)
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 2 mM (Merk, Allemagne)
 - 2-O-nitrophényl β -D-galactopyranoside (ONPG) 4,4 mM (Acros, Belgique)

A.2 Méthode

24 H après la transfection, les cellules sont rincées deux fois avec 1 ml de PBS préchauffé. 300 µl de tampon de lyse sont ensuite déposés sur les cellules. Les plaques 12 puits sont alors agitées 15 minutes à température ambiante. Le lysat cellulaire est récupéré. 100 µl de lysat sont prélevés, déposés dans une plaque 96 puits et mélangés à un volume identique de ONPG.

HBSS pour 500 ml	<ul style="list-style-type: none"> - 4 g de NaCl (Merck, Allemagne) - 0,2 g de KCl (Merck, Allemagne) - 30 mg de KH_2PO_4 (Merck, Allemagne) - 0,5 g de Glucose (Merck, Allemagne) - 26,6 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Allemagne) - 0,175 g de NaHCO_3 (Merck, Allemagne)
HBSS + CaMg 100 ml	<ul style="list-style-type: none"> - 500 μl de MgSO_4 0,16 M (Merck, Allemagne) - 500 μl de CaCl_2 0,24 M (Merck, Allemagne)
Milieu Stock	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu DHG (DMEM High Glucose, 4,5 g /l) (Invitrogen, USA) - Antibiotiques: Pénicilline 0,5$\mu\text{g/ml}$, Streptomycine 50 $\mu\text{g/ml}$ (Gibco, Royaume-Uni)
Milieu complet	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu Stock - 10% de sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Royaume – Uni)

Tableau II.7: composition des différents milieux utilisés lors de la révélation de l'activité EGFP.

Pour réaliser des "blancs", 100 µl de substrat et 100 µl de tampon de lyse sont déposés dans les puits. La plaque est alors placée à 37° C pendant 20 à 30 minutes pour ensuite être lue grâce à un lecteur de plaques à une absorbance de 405 nm. Afin de connaître l'activité β -galactosidase, les valeurs d'absorbance obtenues (auxquelles ont été soustraites les valeurs des blancs) sont multipliées par le facteur de dilution du lysat lors de son prélèvement. L'activité est alors mesurée en unités arbitraires.

B. Révélation histochimique

Les cellules ayant incorporé le plasmide pCMV β et exprimant l'enzyme β -galactosidase, sont également capables de cliver un substrat nommé X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) entraînant ainsi la formation d'un composé bleu. Afin de déterminer l'efficacité de transfection, le nombre de cellules bleues (et donc transfectées) est compté simplement à l'aide d'un microscope.

B.1 Matériels

- PBS: NaCl 0,9 %, KH₂PO₄/ K₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4
- Solution de fixation
 - Formaldéhyde 2 % (Belgolabo, Belgique)
 - Glutaraldéhyde 0,2 % (Fluka, Suisse)
- Solution de coloration (Roche, Allemagne)
 - X-gal 5 %
 - 95 % de Tampon ferreux: ferrocyanure de potassium et ferricyanure de potassium dilué dans du tampon phosphate.

La solution de coloration doit ensuite être diluée 20 X dans du tampon " β gal staining set " (Roche, Allemagne)

B.2 Méthodes

24 h après la transfection, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS préchauffé. Chaque puit reçoit 1 ml de solution de fixation 15 minutes à température ambiante. De nouveau, les cellules sont rincées trois fois avec 1 ml de PBS. Ensuite, 500 µl de solution de coloration sont déposés. Les cellules incubent alors pendant 30 à 60 minutes à 37° C pour ensuite être rincées trois fois au PBS. L'activité est alors visualisable grâce au microscope, les cellules ayant été transfectées étant colorées en bleu.

II.3.2.2 Détermination de l'activité EGFP

Les cellules ayant incorporé le plasmide codant pour la EGFP (description **tableau II.3**) émettent à une longueur d'onde dans le vert en réponse à une excitation par une longueur d'onde dans le bleu ou par des UV. Le Bioanalyzer 2100 (Agilent) utilise cette propriété pour quantifier l'efficacité de transfection par nano-cytométrie de flux.

A. Matériels

- Milieux de culture (**tableau II.7**)
- Solution stérile de trypsine 0,05 % - EDTA 0,53 mM (Gilco BRL, Royaume-Uni)
- Carboxynaphthofluorescein Diacetate 10 µM (cBNF) (Boehringer, Allemagne)
- 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA)
- Centrifugeuse (Biofuge, Allemagne)

Preparing Cells

- 1 Treat cell samples and pellet them according to the application specific protocol.
- 2 Carefully remove supernatant with a pipette tip.
- 3 Add an appropriate volume of cell buffer (● green) to reach a final concentration of 2.0 million cells/ml.
- 4 Resuspend cell pellet.
- 5 Check visually if there are any cell clumps or agglomerates left
- 6 If yes, repeat step 4.
- 7 If cell clumps or agglomerates cannot be removed by vortexing, use cell strainers (40 μ m) to filter the cell suspension before loading on the chip.
- 8 Immediately load cells onto the chip after loading chip priming solution, focusing dye solution and cell buffer.

Loading the Chip Priming Solution

- 1 Pipette 10 μ l of priming solution (○ white) in the priming well (PS).
- 2 Wait for 60 seconds.



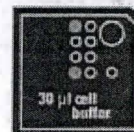
Loading the Focusing Dye Solution

Pipette 10 μ l of focusing dye solution (● yellow) into the focusing well (FD).



Loading the Cell Buffer

Pipette 30 μ l of cell buffer (● green) into each of the 2 buffer wells (CB).



Loading the Samples

- 1 Pipette 10 μ l of sample in each of the 6 sample wells.
- 2 Place prepared chip in the Agilent 2100 bioanalyzer and start the run within 5 minutes.

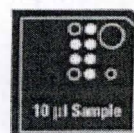


Figure II.3 : Protocole d'utilisation du bioanalyseur .

Solution	Composition
Tampon de lyse (PLB)	Passive Lysis Buffer (PLB) 5 X
Substrat de la luciférase (LAR II)	Luciférase Assay Substrate (LAS) 10 ml Luciferase Assay Buffer II (LAB)
Agent de quenching "Stop and Glo"	Pour 10 tubes: 20 µl Stop and Glo® Substrate 50X + 1 ml Stop and Glo® Buffer.

Tableau II.8:Composition des différents réactifs du kit"Dual Luciferase Reporter Assay System"

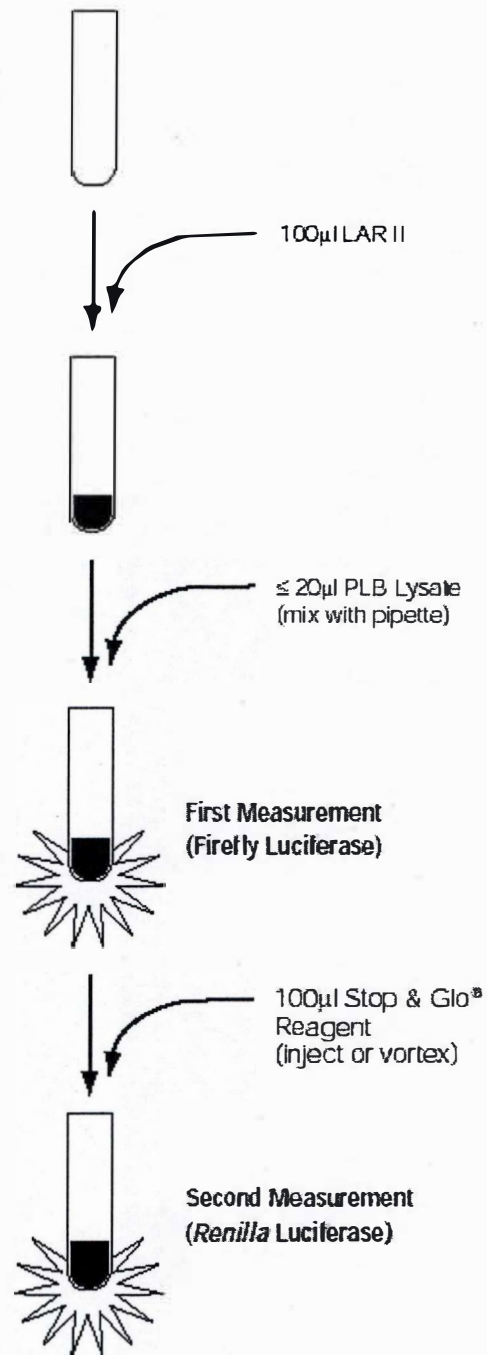


Figure II.5 : Schéma représentant le protocole de révélation de l'activité Dual luciférase (d'après le manuel d'instruction de Promega).

B. Méthode

24 H après la transfection, les cellules rincées deux fois avec de l'HBSS + CaMg préchauffé puis incubées avec 1 ml de HBSS + CaMg + cBNF (1 µl/ml). Dès que la sonde est déposée, toutes les étapes qui suivent se font à l'abri de la lumière.

Deux rinçages avec de l'HBSS seul sont ensuite effectués et les cellules sont décrochées à l'aide de 0,4 ml de trypsine + EDTA. Son action est ensuite inhibée par l'ajout de 1 ml de milieu complet et la suspension cellulaire est centrifugée quatre minutes à 2000 RPM. Le surnageant est alors décanté délicatement et le culot resuspendu dans un tampon "cell buffer" de sorte que la densité cellulaire atteigne de $2 \cdot 10^6$ cellules par ml.

Le bioanalyseur est ensuite utilisé (**figure II.3**) pour permettre de quantifier l'efficacité de transfection. Le principe du bioanalyseur consiste à focaliser les cellules grâce à des forces hydrodynamiques dans des canaux avant que celles-ci ne passent de façon individuelle devant un détecteur de fluorescence. La sonde cBNF qui émet une longueur d'onde située dans le rouge à 675 nm suite à une excitation par une longueur d'onde émise à 595 nm est incorporée par les cellules vivantes. Les résultats sont alors fournis sous forme de Dot Plot, d'histogrammes ou encore de données statistiques et représentent le nombre d'événements totaux c'est-à-dire le nombre de cellules ayant incorporé la sonde sur le nombre de cellules ayant incorporé le plasmide d'intérêt dans le cas du Dot Plot.

II.3.2.3 Révélation de l'activité dual-luciférase

La luciférase "firefly" (*Photinus pyralis*) est une protéine monomérique de 61 KDa directement active après transcription. L'oxydation de la luciférase en présence d'ATP, de Mg^{2+} et d' O_2 conduit à la formation d'un intermédiaire instable appelé luciféryl-AMP. Celui-ci est rapidement converti en oxyluciférine accompagnée d'une émission de photons dans une bande de longueur d'onde de 550 à 570 nm. Nous avons utilisé le kit Dual Luciferase Assay Reagent de Promega qui comprend l'agent de lyse des cellules et les substrats de la luciférase "firefly" pour révéler son activité.

La luciférase "Renilla" (*Renilla reniformis*) est une protéine monomérique de 36 KDa directement active. En présence d' O_2 , la luciférase catalyse la réaction de conversion de la coéclenterazine en coéclentéramide accompagnée de la libération de CO_2 et de l'émission de photons. Le kit de Promega possède également les substrats de la luciférase "Renilla" et les agents de quenching arrêtant la réaction de la luciférase "firefly". Les réactions enzymatiques sont illustrées à la **figure II.4**.

A. Matériels

- PBS: NaCl 0,9 %, KH_2PO_4/K_2HPO_4 10 mM, pH 7,4
- Kit Dual luciférase assay system (Promega, USA) (**tableau II.8**)
- Luminomètre (Biocounter M2010, Lumac, Landgraaf, Pays-Bas)

B. Méthode

24 H après la transfection ou la stimulation, les cellules sont rincées deux fois dans du PBS. En présence de 300 µl de PLB, les cellules sont placées sous faible agitation 15 minutes. Une fois la lyse terminée, 20 µl de ce lysat cellulaire sont déposés dans des tubes lumac contenant déjà 100 µl de substrat LARII. L'émission de photons correspondant à l'activité luciférase "firefly" du tube sera alors mesurée pendant 10 secondes par un luminomètre.

Les mêmes tubes reçoivent ensuite 100 µl de Stop and Glo, sont vortexés et subissent une deuxième lecture qui caractérise l'émission due cette fois, à la luciférase "Renilla".

Il faut également prévoir un blanc contenant 20 µl de tampon de lyse (**figure II.5**).

II.4 Evaluation de la cytotoxicité

Afin de quantifier la cytotoxicité des conditions de stimulations et de transfections, nous avons effectué deux types de dosage: le dosage protéique par la méthode de Bradford et le dosage au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl) 2-5- diphényltétrazolium) au sein des cellules.

II.4.1 Dosage protéique par la méthode de Bradford

Son principe se base sur le fait que l'absorbance d'une solution acide de bleu de Coomassie G-250 se déplace de 465 à 595 nm lorsque le colorant se lie aux protéines. Les interactions ioniques et hydrophobes stabilisent les complexes protéine-colorant causant un changement de couleur, du rouge/brun à l'état libre au bleu, visible pendant au moins 60 minutes. L'absorbance est alors mesurée à 595 nm au spectrophotomètre, l'intensité étant proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le lysat. Le dosage de protéines permet notamment de normaliser l'activité β -galactosidase en l'exprimant en u.a /100 ug de protéines. Il a été également montré au cours de nombreuses expériences que ce dosage protéique est généralement proportionnel à la viabilité des cellules.

II.4.1.1. Matériels

- Etalon d'albumine sérique bovine (BSA): 2 mg /ml (Pierce, USA)
- Réactif Bradford (Bleu de Coomassie) dilué 5 X dans l'eau distillée et filtré (Bio-Rad, USA)
- Tampon de lyse (selon le protocole utilisé)
- Spectrophotomètre (Ultrospec 2100 Pro, Amersham, Royaume-Uni)
- Echantillon

II.4.1.2 Méthode

De minute en minute, 1 μ l du lysat cellulaire à doser est ajouté à 1 ml de réactif de Bradford. Après avoir vortexé le mélange et laissé incuber 5 minutes, la densité optique est mesurée grâce à un spectrophotomètre à 595 nm. Il faut également prévoir un tube (blanc des échantillons) contenant 1 ml de réactif Bradford et 1 μ l de tampon de lyse, ainsi qu'un tube (blanc de l'étalon) contenant quant à lui 1 ml de réactif Bradford et 1 μ l d'eau. A partir d'un étalon BSA de concentration connue (2 mg / ml), la concentration protéique peut être ensuite calculée selon la formule suivante:

$$\text{Concentration (mg / ml)} = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO blanc})}{(\text{DO étalon} - \text{DO blanc})} * \text{Concentration étalon (mg / ml)}$$

II.4.2 Mesure de l'incorporation cellulaire et de la réduction du MTT

Les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium) et le clivent en molécules de formazan qui forment des cristaux insolubles en milieu aqueux et de coloration mauve. Cette réaction est catalysée par la succinate déshydrogénase que l'on retrouve au niveau des mitochondries. Afin de déterminer la toxicité d'une substance, l'absorbance est lue à 570 nm. En effet, le nombre de cellules capables de faire cette réaction diminue avec la toxicité de la substance. Une corrélation peut être établie entre la viabilité et le nombre de molécules de MTT réduit.

II.4.2.1 Matériels

- Colorant MTT (Sigma, USA)
- PBS: NaCl 0,9 %, KH_2PO_4 / K_2HPO_4 10 mM, pH 7,4

Etape	Solution	Composition
Migration électrophorétique	Tampon de charge	- 100 µl NU PAGE LDS Sample (Invitrogen, Carlsbad) - 5 µl DTT: dl-Dithiothréitol 1 M (Sigma,USA)
	Tampon de migration I	Pour 1 l: - 50 ml de MOPS SDS running Buffer 20 X (Invitrogen, USA)
	Tampon de migration II	- 200 ml de tampon de migration I - 500 µl d'antioxydants NU PAGE (Invitrogen, Carlsbad)
Transfert sur membrane	TBS 10X Stock	Pour 1 l: - 24,22 g de Tris - 80,06 g de NaCl - pH 7,4 ajusté grâce à du HCl
	TBS-T 0,1 %	Pour 1 l - 10 ml de TBS 10 X - 0,1 % de Tween 20 (Sigma Aldrich,USA)
	Tampon de transfert	Pour 200 ml - 10 ml tampon de transfert stock (PAGE Transfert Buffer 20 X) (Invitrogen, Royaume-Uni) - 200 µl d'antioxydants - Méthanol 20 % (2 membranes) ou 10 % (1 membrane)
Blocking	Solution de blocking	Pour 50 ml - Gloria 5 % : lait écrémé en poudre (Nestlé, Belgique) - 50 ml de TBS-T 0,1% - <i>BSA dans le cas des formes phosphorylées.</i> (Bovine serum albumin, fraction serum minimum 96 % lyophilized powder (Sigma, USA).
Révélation	Révéléateur	Pour 2,18 l - 360 ml de la solution de révélation stock (Ilford) - 1800 ml d'eau distillée
	Solution de fixation	Pour 2,18 l - 360 ml de la solution de fixation stock (Ilford) - 1800 ml d'eau distillée

Tableau II.9: Composition des différents tampons et solutions utilisés lors du Western Blot

- Tampon de lyse:
 - 2 volumes de SDS 30 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - 1 volume de N, N diméthyl formamide (Biosalve, Pays-Bas)
 - porter à pH 4,7 avec une solution acide (acide acétique 80%, HCl 1 N en rapport 9/1)
- Spectrophotomètre (Biorad Ultramark Microplate Imaging System, USA)

II.4.2.2 Méthodes

Les cellules sont incubées en présence de la molécule à tester. Une fois la stimulation terminée, 500 µl de colorant sont ajoutés. Les cellules sont alors incubées 2 H à 37° C et 5 % de CO₂ laissant ainsi le temps aux cellules métaboliquement actives d'incorporer et de cliver le MTT en cristaux insolubles de formazan.

Le surnageant est enlevé délicatement et 1 ml/puits de tampon de lyse est rajouté. Les plaques sont incubées 2 H à 37°C sous faible agitation puis lues à 570 nm au colorimètre. Il faut veiller à prévoir des blancs, la valeur de ceux-ci devant être soustraite de la valeur de chacun des puits "test". En multipliant par 100 le rapport entre la moyenne de chaque puits test et la valeur de la moyenne des blancs, on obtient le pourcentage de survie.

II.5 Western Blotting à partir d'extrait totaux

Au cours de ce mémoire, nous avons tenté de mettre en évidence dans nos modèles cellulaires l'expression des différents récepteurs au LPA (les récepteurs membranaires EDG et le facteur PPAR γ) à l'aide de la technique du western blot. Celle-ci consiste en la séparation des protéines d'un extrait cellulaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS. Les protéines sont séparées suivant leur poids moléculaire grâce à la différence de potentiel appliquée de part et d'autre du gel. En fin de migration, elles sont transférées sur une membrane en fluorure de poly-vinylidène fluoride (PVDF). La présence de la protéine d'intérêt sera mise en évidence grâce à un couplage anticorps primaire spécifique/ anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP ou horse radish peroxydase).

La révélation se fera via une incubation de la membrane de PVDF dans une solution contenant le substrat de la HRP et du luminol. L'émission de photons produite par la réaction permettra d'impressionner un film autoradiographique. Dans la zone de linéarité d'exposition avant saturation, le signal est proportionnel à la quantité d'anticorps présents et donc à l'abondance de la protéine d'intérêt.

II.5.1 Matériels

- Gel Agarose NU PAGE: Gel 10 % Bis-Tris, 10 puits x 1,5 mm (Invitrogen, Royaume-Uni)
- Etalon de poids moléculaire See Blue Plus (Invitrogen, USA)
- Solution et tampon de migration (**tableau II.9**)
- Cuve d'électrophorèse (Invitrogen, USA)
- Générateur (Amersham Pharmacia Biotechnology, Royaume-Uni)
- Papier Whatman (Merck, Allemagne)
- Membrane PVDF (Amersham Biosciences Hyband- P, Royaume-Uni)
- Méthanol (Merck, Allemagne)
- Solution et tampon de transfert (**tableau II.9**)
- Solution de blocking (**tableau II.9**)
- Anticorps primaire polyclonal de lapin anti-EDG 2 (Upstate Biotechnology, USA)
- Anticorps primaire polyclonal de lapin anti-EDG 4 (Exalpha, USA)
- Anticorps primaire polyclonal de lapin anti-EDG 7 (Exalpha, USA)
- Anticorps primaire monoclonal de souris anti- α -tubuline (Sigma, USA)
- Anticorps primaire polyclonal de lapin anti-PPAR γ (Santa Cruz, USA)
- Anticorps secondaire de chèvre anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (Sigma, USA)
- Anticorps secondaire de singe anti-IgG de souris couplé à la peroxydase
- Film autoradiographique: "Hyperfilm" (Amersham Pharmacia Biotechnology, Royaume-Uni)

Tampon de lyse	Composition
Tampon Biosource	<ul style="list-style-type: none"> - NaCl 100 mM - SDS 0,1 % - DOC (Deoxycholate) 0,5 % - Glycérol 10 % - NP-40 1 % - Tris 10 mM
Tampon de lyse complet	<ul style="list-style-type: none"> - Tampon de lyse stock 1 ml - 40 µl PIC (Phosphatase Inhibitor Cocktail) - 40 µl PIB (Phosphate Inhibitor Buffer)
Tampon de lyse gel 2D	<ul style="list-style-type: none"> - Urée 6 M - DTT 1 % - Thiourée 2 M - Chaps 2 % - Inhibiteurs de protéase (PIC) 2 % - Pharmalyte 3-10 1 % - SB 3-10 2 %

Tableau II.10: Composition des tampons de lyse testés.

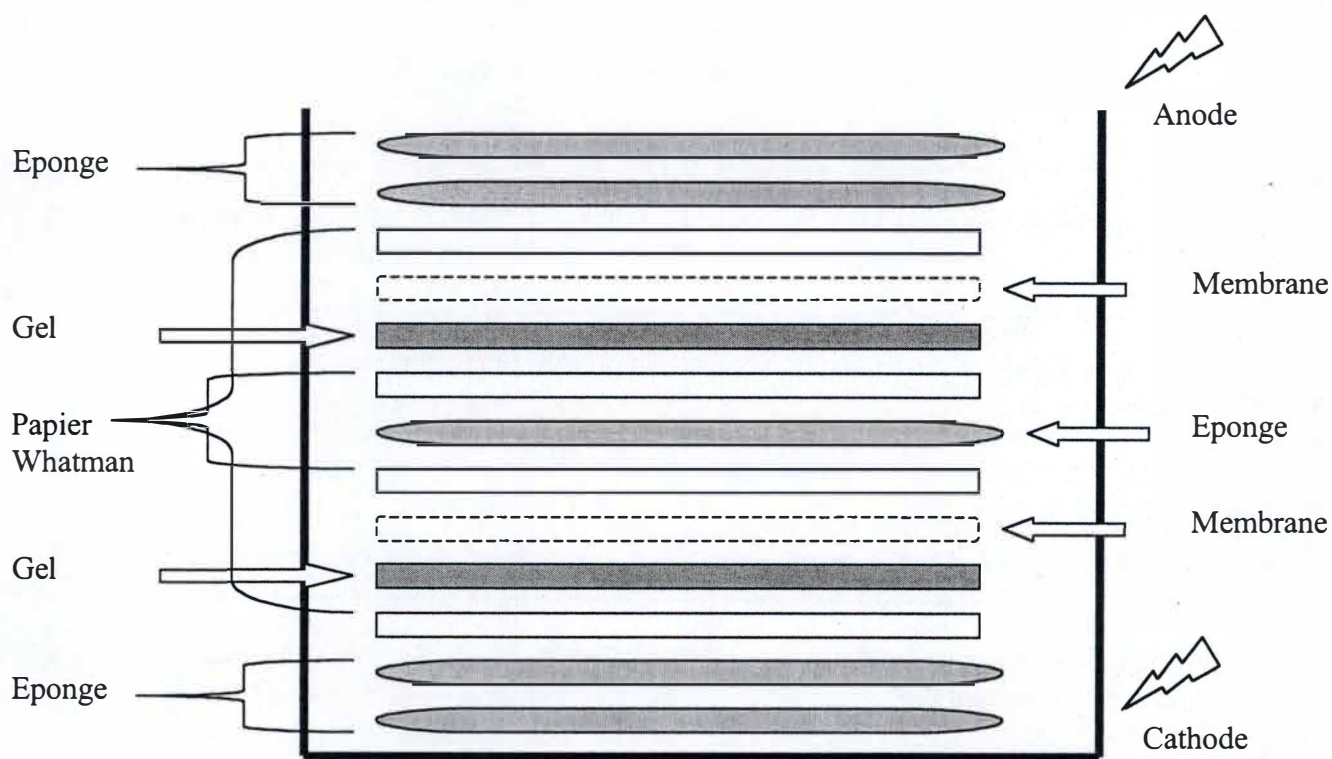


Figure II.6: Représentation du montage en Sandwich nécessaire lors de l'étape de transfert. Le schéma montre la façon dont le système doit être monté lorsque deux membranes différentes sont utilisées.

Anticorps	Dilution	Solution de dilution	Temps d'incubation
Anticorps primaire polyclonal de lapin anti-EDG 2	1.000X	TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria	2 H
Anticorps primaire polyclonal de lapin anti-EDG 4	1.000X	TBS-T 0,1 %, + 5 % Gloria	2 H
Anticorps primaire polyclonal de lapin anti-EDG 7	1.000 X	TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria + 5 % BSA	2 H
Anticorps primaire polyclonal de lapin anti-PPAR γ	10.000 X	TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria + 5 % BSA	2 H
Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase	100.000 X	TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria + 5 % <i>BSA pour EDG 7</i>	1 H
Anticorps primaire monoclonal de souris anti- α -tubuline	40.000 X	TBS-T 0,1 %, 5 % Gloria + 5 % <i>BSA pour EDG 7</i>	2 H
Anticorps secondaire de singe anti-IgG de souris couplé à la peroxydase	100.000 X	TBS-T 0,1 %, 5 % Gloria + 5 % <i>BSA pour EDG 7</i>	1 H

Tableau II.11: Liste des différents anticorps utilisés suivant la dilution souhaitée.

- Kit de révélation "ECL advance Western blotting" mélange volume/volume des solutions A et B (Amersham, Royaume-Uni)
- Centrifugeuse (Heraeus, Biofuge, Allemagne)

II.5.2 Méthode

II.5.2.1 Préparation des lysats totaux et dosage protéique

Pour solubiliser au mieux les protéines et en particulier les récepteurs membranaires au LPA, deux tampons de lyse de composition différente ont été testés (**tableau II.10**).

Après avoir rincé deux fois le tapis cellulaire avec 3 ml de PBS, 100 µl de tampon de lyse complet sont ajoutés. Les cellules sont alors raclées et le lysat récolté afin d'être soumis à une agitation de 400 RPM pendant 30 minutes à 15° C suivie d'une centrifugation 10 minutes à 13.000 RPM et 15° C. Le surnageant est alors récupéré, dosé par la méthode de Bradford (voir point II.4.1) et stocké à - 70° C.

II.5.2.2 Préparation des échantillons et migration

Pour chaque condition, un volume de lysat correspondant à 40 µg de protéines est prélevé et mélangé à 5 µl de tampon de charge si nécessaire. Ce volume sera porté à 20 µl à l'aide d'un tampon de lyse. Tous les échantillons sont alors placés durant 10 minutes sur une plaque chauffante à 70° C puis centrifugés à 13.000 RPM pendant une minute avant d'être chargés sur le gel. Un puits servira à accueillir 7 µl d'étalon de poids moléculaire. Le tampon de migration II (**tableau II.9**) est alors déposé entre les gels et 600 µl du tampon de migration I sont déposés autour de ceux-ci. La cuve est alors reliée à un générateur pour une migration de 60 minutes (200 V, 400 mA).

II.5.2.3 Transfert sur membrane

Une fois la migration terminée, le gel est déposé sur une membrane en PVDF préalablement réhydratée pendant 1 minute dans du méthanol, puis 5 à 15 minutes dans un autre contenant le tampon de transfert. Afin notamment de faciliter le passage des protéines vers la membrane, des papiers whatman et des éponges imbibées de tampon de transfert, sont placés de part et d'autre de ces deux couches selon le schéma de sandwich décrit à la **figure II.6**. Ce montage est alors déposé dans une cuve de transfert, la membrane orientée vers l'anode. Le transfert se déroule sous un ampérage de 250 mA pendant 2H30 à 30 V.

II.5.2.4 Révélation de la membrane avec des anticorps

Quand le transfert est terminé, la membrane est incubée 2 H dans la solution de blocking adéquate (**tableau II.9**) dans le but de saturer les sites de liaison aspécifique. Ensuite la membrane est mise en présence de la solution d'anticorps primaires spécifiques préalablement dilués dans la solution adéquate (**tableau II.11**). Elle est incubée alors pendant 2 H sous légère agitation à température ambiante. L'incubation terminée, les excès d'anticorps sont éliminés par trois rinçages de 15 minutes suivis de deux rinçages de 5 minutes dans une solution de TBS-T 0,1 %.

Selon l'anticorps primaire utilisé, la détection se fera par incubation de la membrane avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris couplés à la peroxydase (HRP) et dilués de façon adéquate (**tableau II.9**). Cette incubation dure 1 H à température ambiante. Suite à cela, une nouvelle série de lavages dans du TBS-T 0,1 % a lieu (3x5 minutes et 2x5 minutes).

Enfin, la membrane est incubée 5 minutes dans un petit volume de solution de révélation "ECL advance" avant d'être transportée en chambre noire pour sa révélation autoradiographique

L'exposition des films autoradiographiques sera de durée variable afin d'obtenir l'exposition optimale. Le film est alors baigné successivement dans du révélateur, de l'eau et du fixateur avant d'être rincé à l'eau distillée et séché à température ambiante.

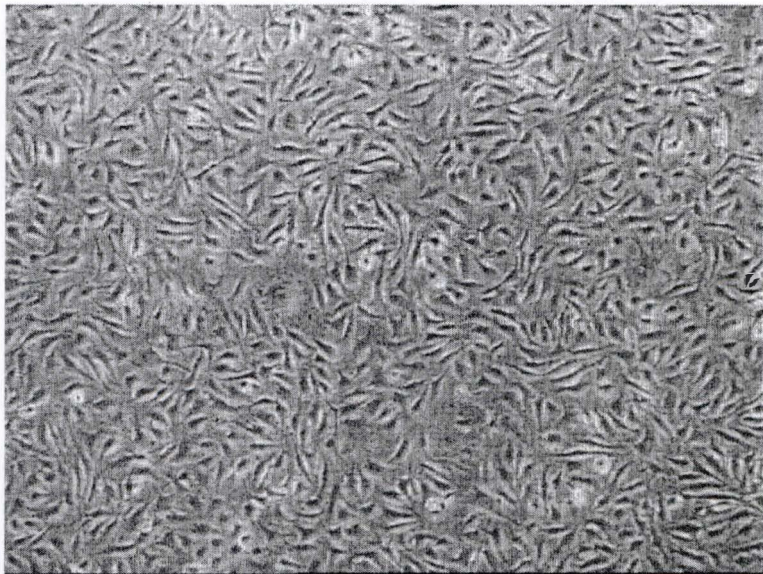
II.5.2.5 Contrôle de charge

Pour s'assurer que la même quantité de protéines a été chargée dans chaque puits, nous allons à partir de la membrane, mettre en évidence la présence d'une protéine dont le niveau d'expression reste constant quelle que soit la condition expérimentale: l' α -tubuline. Pour ce faire, la membrane est de nouveau incubée dans la solution de blocking à 4° C pendant une nuit sous légère agitation. Le mode de révélation reste identique, si ce n'est que l'anticorps primaire est un anticorps de souris dirigé contre l' α -tubuline et que l'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de souris (dilutions et solutions, tableau II.11).

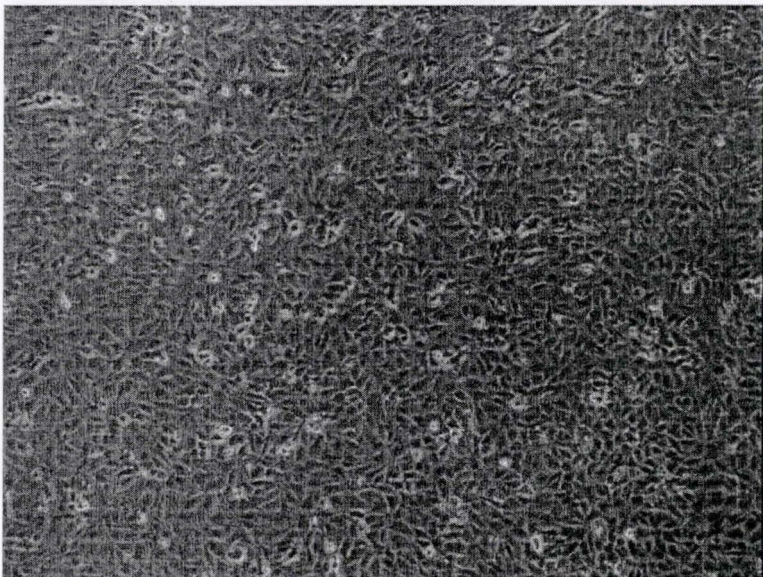
III. Résultats et **discussions**



EAhy926 Jour 1 après le repiquage 1 :3



EAhy926 Jour 2 après le repiquage 1 :3



EAhy926 jour 3 après la dilution 1 :3

Figure III.1: Micrographies en contrate de phase illustrant l'évolution au cours du temps d'une culture de cellules endothéliales EAhy926 repiquées 1:3 (grossissement à l'objectif X10)

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le LPA est une molécule pouvant exercer des effets à la fois pro- ou anti-athérogènes. Nous avons donc voulu tenter d'élucider les voies de transduction du signal empruntées par cette molécule au sein des cellules endothéliales. Des difficultés techniques liées aux problèmes de transfection de ces cellules endothéliales, nous ont amenés à également étudier un modèle bien connu de cellules épithéliales, les cellules Hela. Notre travail consistera donc en deux grandes étapes, et ce pour chacun des deux types cellulaires étudiés. Tout d'abord, il nous faudra mettre en évidence la présence des récepteurs membranaires classiques au LPA tels que les récepteurs LPA1, LPA2, LPA3 et ce par western blotting. Dans la deuxième étape de notre travail, nous essayerons de confirmer les données récentes rapportées par McIntyre et ses collègues (McIntyre et al., 2003) indiquant que le LPA, en tous cas pour des cellules d'une lignée monocytaires (RAW2647), serait un ligand des récepteurs nucléaires PPARs, pour ce faire, nous nous attarderons à la mise au point de la technique de transfection sur les 2 modèles cellulaires afin de pouvoir utiliser des systèmes rapporteurs. En effet, pour suivre l'activation du facteur PPAR γ , la technique de retard sur gel ou les test colorimétriques de binding (Renard et al., 2001) utilisées couramment au laboratoire pour une série de facteurs transcriptionnels (NF κ B, AP-1, HIF,...) ne conviennent pas, car PPAR γ est lié de manière constitutive à l'ADN. Son activation agoniste-dépendante est donc généralement suivie grâce à un plasmide rapporteur où un gène rapporteur (β -galactosidase, luciférase,...) est sous le contrôle d'un promoteur comportant le motif PPRE en plusieurs exemplaires ou d'un promoteur authentique comportant un PPRE fonctionnel (tel le promoteur du gène encodant le CD36) (voir par exemple McIntyre et al, 2003).

III.1 Les cellules endothéliales EAhy926

III.1.1 Présentation du modèle cellulaire EAhy926

Le choix d'un modèle d'étude de cellules endothéliales n'est pas simple. Il faut en effet à la fois, associer la relevance physiologique de ce modèle à des aspects pratiques tels que la disponibilité des cellules, les contraintes de culture qu'elles imposent, ... Nous avons pour ce mémoire, choisi de travailler avec un modèle de cellules hybrides, les EAhy926. Celles-ci proviennent de la fusion entre des cellules HUVEC, lignée primaire de cellules endothéliales humaines de veine ombilicale et des cellules non endothéliales de la lignée permanente A549/8, issues d'un carcinome de poumon. Ces cellules possèdent des caractéristiques propres aux cellules endothéliales notamment la capacité d'exprimer le facteur de Von Willebrand (Edgell et al., 1983). Elles répondent bien à l'hypoxie (C.Michiels et ses collaborateurs) et au TNF α (F.Maréchal, DES 2003-2004). Elles ont également pour particularité de pouvoir effectuer plus d'une centaine de passages en culture.

La figure **III.1** illustre l'évolution au cours du temps de la culture de ces cellules repiquées selon une dilution 1:3.

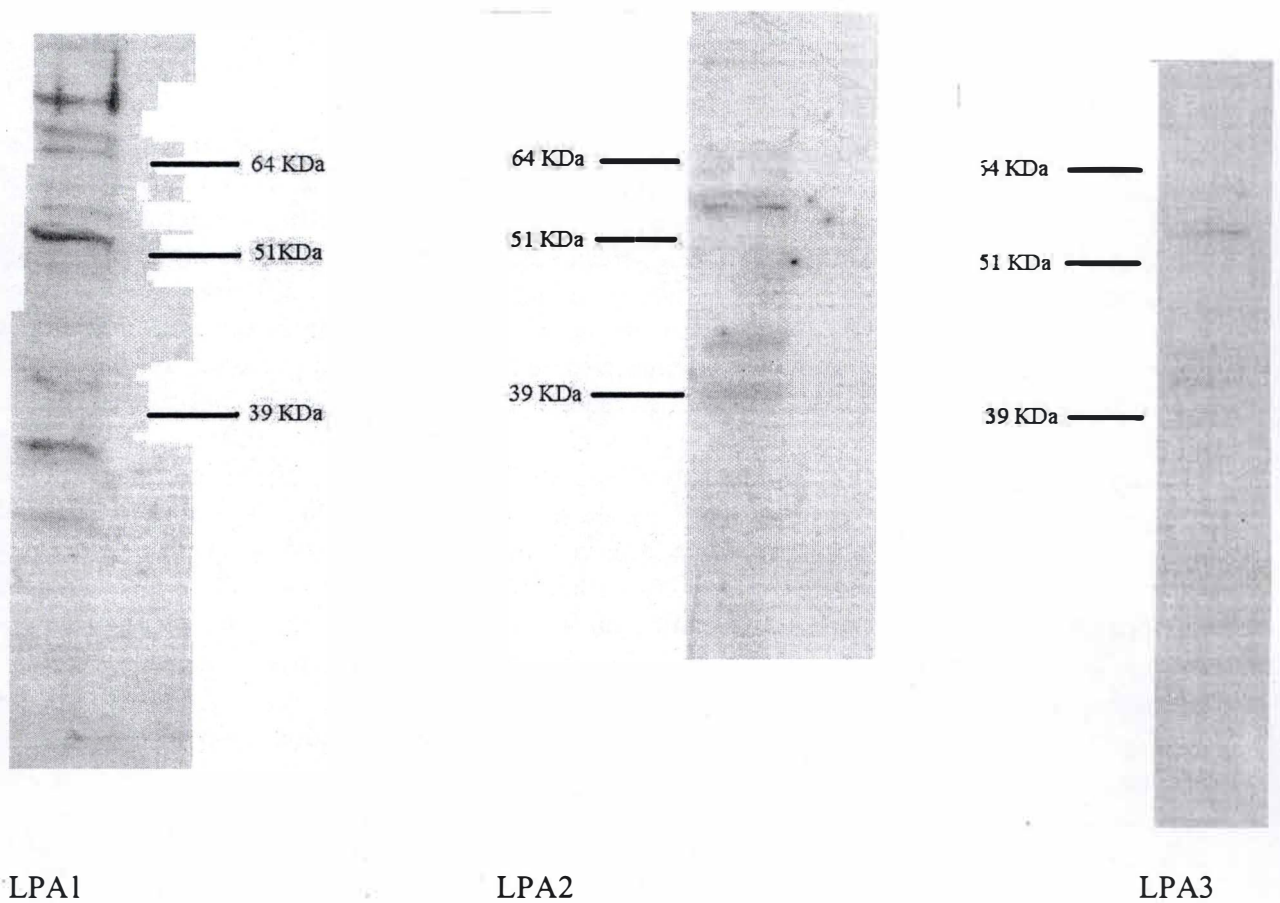


Figure III.2: Mise en évidence de la présence des récepteurs membranaires LPA1, LPA2 et LPA3 à partir extraits protéiques totaux obtenus de cellules endothéliales. L'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-LPA1, ou anti-LPA2 ou anti-LPA3 a été dilué 1:5.000 dans une solution TBS-T 0,1 %. Les membranes ont été mises à incuber 2 heures sur rouleaux à température ambiante. L'anticorps secondaire monoclonal de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, a été dilué 1:100.000X dans la même solution. Les membranes ont incubés cette fois-ci une heure. Le temps d'exposition dans la cassette est de 10 minutes pour chaque récepteur. Le poids théorique est de respectivement 45, de 39 et de 40 KDa.

III.1.2 Expression des récepteurs membranaires au LPA

Afin de mettre en évidence la présence de récepteurs membranaires au LPA sur ces cellules, nous avons utilisé la technique du Western Blot. Les cellules EAhy926 sont cultivées dans un milieu DHG + 10 % sérum + antibiotiques et sont généralement repiquées 3 jours avant le début de l'expérience à une densité de $1,5 \cdot 10^6$ de cellules par T25 afin d'être dans un état de confluence le jour débutant l'expérience.

Les anticorps utilisés au cours de ce mémoire sont des anticorps primaires polyclonaux de lapin dirigés contre les récepteurs LPA1, LPA2 ou LPA3 humains. L'anticorps dirigé contre le récepteur LPA1 reconnaît une séquence de 16 acides aminés, la fiche technique ne donne cependant pas plus de détails. Celui dirigé contre le récepteur LPA2 reconnaît quand à lui, une séquence unique dérivée d'un peptide en position N-terminale. L'immunogène du récepteur LPA3 est également une séquence unique dérivée d'un peptide mais en position C-terminale cette fois. Les poids moléculaires théoriquement attendus des récepteurs LPA1, LPA2, LPA3 sont respectivement de 45, 39 et 40 KDa, comme signalé dans les fiches techniques. Ces poids se basent sur la composition en acides aminés de chaque récepteur. L'anticorps secondaire monoclonal de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase permettra de mettre en évidence la présence de ces récepteurs. Etant donné que ces protéines n'avaient jamais été étudiées au laboratoire, il a fallu procéder à une série de mises au point.

En outre, ces récepteurs sont membranaires, possèdent un domaine transmembranaire hydrophobe et sont donc difficile à extraire. C'est pourquoi il a fallu recourir à des mises au point au niveau de la lyse en jouant sur la composition des tampons de lyse. Deux tampons de lyse de compositions différentes ont été testés (**tableau II.10**). La thiourée retrouvée dans le tampon "Biosource" et le SB 3-10 du tampon "gel 2D" sont des détergents utilisés pour solubiliser les protéines membranaires. Nous avons également chargé une quantité plus importante de protéines (40 μ g) par rapport aux quantités utilisées pour une protéine cytoplasmique et ce dans le but d'augmenter l'enrichissement de ces récepteurs dans le volume de charge. Après avoir effectué un Western Blot en parallèle sur des cellules ayant été lysées par le tampon "Biosource" ou par le tampon "gel 2D", nous avons comparé les résultats obtenus au niveau du bruit de fond et de l'intensité des bandes. Il en est ressorti que les deux tampons possédaient une efficacité similaire. Nous avons alors décidé de travailler avec le tampon "Biosource", celui-ci étant moins cher. Nous avons également joué sur la dilution des anticorps et sur la nature de l'agent bloquant les sites de liaison non spécifique.

Nous avons commencé par diluer l'anticorps primaire suivant une dilution 1:5.000 pour chacun des récepteurs dans une solution de blocking composée de TBS contenant 0,1 % de tween et 5 % de Gloria. Le temps d'incubation sur rouleaux à température ambiante était de deux heures. L'anticorps secondaire quand à lui, fut dilué 1:100.000 dans la même solution et mis en présence des membranes durant une heure à température ambiante. Lors du développement sur film photosensible, le temps d'exposition dans la cassette était de 10 et 15 minutes. Le résultat de ce western blot est montré à la **figure III.2**.

Pour rappel, les poids moléculaires théoriquement attendus sont respectivement de 45, 39 et 40 KDa pour les récepteurs LPA1, LPA2 et LPA3. Pourtant, nous trouvons dans chacune des pistes, une bande de plus forte intensité aux environs de 51 KDa. Suite à cela, nous avons mené des recherches bibliographiques portant sur des Western Blot réalisés pour ces mêmes récepteurs. Nous avons comparé nos résultats à ceux décrits dans la littérature, et notamment à ceux de Gobeil et ses collaborateurs. Ceux-ci concernaient eux aussi la mise en évidence de la présence de ces récepteurs sur différents types cellulaires, dont des cellules endothéliales cérébrales, par Western Blot (Gobeil et al., 2003). Tout comme dans nos résultats, le poids moléculaire de la bande pour le LPA1 se situait aux environs de 49 KDa et ils en conclurent

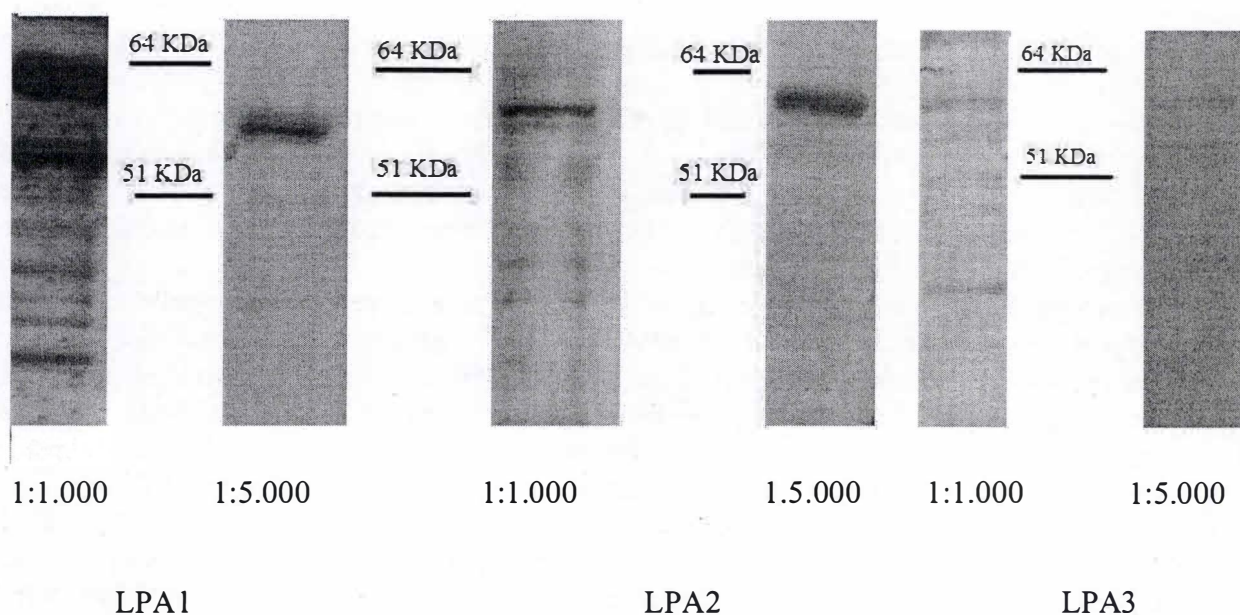


Figure III.3: Mise en évidence de la présence des récepteurs membranaires LPA1, LPA2 et LPA3 à partir d'extraits protéiques totaux obtenus sur des cellules endothéliales. Les anticorps primaires ont été dilués 1:1.000 ou 1:5.000 dans une solution de blocking contenant du TBS-T 0,1%, 5 % Gloria et 5 % BSA. Les membranes sont incubées deux heures sur rouleaux à température ambiante. L'anticorps secondaire a été dilué 1:100.000 dans la solution de blocking et a été mis en présence des membranes durant une heure à température ambiante sur rouleaux. Le temps d'exposition pour chaque membrane est de 5 minutes.

que les récepteurs de cette famille devaient être glycosylés et donc retardés lors de la migration électrophorétique, ce qui permettait dès lors d'expliquer leur poids moléculaire supérieur.

Pour confirmer cette hypothèse, ils testèrent différents inhibiteurs de la N-glycosylation: la tunicamycine et l'endoglycosidase PNG-ase F. Après traitement avec la PNGase-F, la bande fut bien retrouvée aux alentours de 40 KDa.

Ce genre d'observations a également été réalisé chez des lymphocyte T (Zheng et al., 2001). Nous pouvons donc considérer que la bande de plus forte intensité mise en évidence lors de notre expérience, était bien celle recherchée, et ce pour les trois récepteurs au LPA. Dans le cas précis du LPA1, nous pouvons observer la présence de différentes bandes et donc d'un bruit de fond élevé. Par la suite, nous avons donc tenté de diminuer le bruit de fond, sans pour autant diminuer l'intensité du signal.

En ce qui concerne LPA2 et LPA3, malgré le peu de bandes parasites, le signal obtenu reste assez faible. De plus, lorsque le temps d'exposition du film photosensible augmente, un bruit de fond apparaît. Dans ce cas aussi, nous avons donc tenté d'augmenter le signal sans augmenter le bruit de fond en modifiant les conditions expérimentales.

Lors de notre deuxième tentative, nous avons testé une dilution 1:1.000 et 1:5.000 de l'anticorps primaire dans une solution de blocking contenant **5 % de BSA** supplémentaires par rapport à la composition de départ. La BSA est couramment utilisée en tant que protéine inerte pour bloquer les sites de liaison non spécifique. La dilution de l'anticorps secondaire est restée la même que précédemment.

Les résultats obtenus se trouvent à la **figure III.3**.

Lorsque l'anticorps primaire est dilué 1:5.000 pour le récepteur LPA1, le bruit de fond diminue et permet d'avoir une bande plus "propre" que celle obtenue à la **figure III.2**. Diluer l'anticorps primaire 1:1.000 augmente le bruit de fond comme on pouvait s'y attendre même pour un temps d'exposition plus court (5 minutes) et malgré l'utilisation de BSA.

En ce qui concerne le récepteur LPA2, la bande se révèle d'intensité plus forte lorsque l'anticorps est dilué 1:5.000 après un temps d'exposition de 5 minutes en comparaison à un temps d'exposition de 10 minutes obtenu à la **figure III.2**. De nouveau, de façon attendue le bruit de fond augmente pour une dilution 1:1.000.

Enfin, nous n'avons pas obtenu de résultats significativement meilleurs pour le LPA3. Au contraire, pour une dilution 1:5.000 la bande n'apparaît que très faiblement, même pour une exposition allant jusqu'à 15 minutes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la BSA contient des restes d'immunoglobulines qui pourraient réaliser des cross-réactions avec les anticorps de la membrane et les en détacheraient. En ce qui concerne la dilution 1:1.000, le bruit de fond augmente une fois de plus de façon importante.

Ces premiers résultats sont encourageants puisque nous constatons que le modèle cellulaire utilisé exprime bien les trois récepteurs LPA1-3. Mais il nous restait des optimisations à faire. Il se fait qu'à ce moment au laboratoire, le protocole classique de western blot, a été complètement revu, nouveau protocole qui avec des dilutions bien plus importantes des anticorps primaires et secondaires, donnaient des résultats très convaincants, avec peu de bruit de fond et peu de bandes parasites. Il était donc logique de vouloir appliquer ce nouveau protocole aux trois récepteurs au LPA.

La caractéristique principale de ce nouveau protocole est l'utilisation d'une solution de blocking se préparant à partir du lait en poudre fourni par la firme Amersham dans le kit de détection "ECL Advance" à la place du Gloria. De plus, sa concentration est plus faible, elle est en effet de 2 % à la place de 5 % pour le Gloria. La BSA étant relativement chère, elle ne sera plus utilisée.

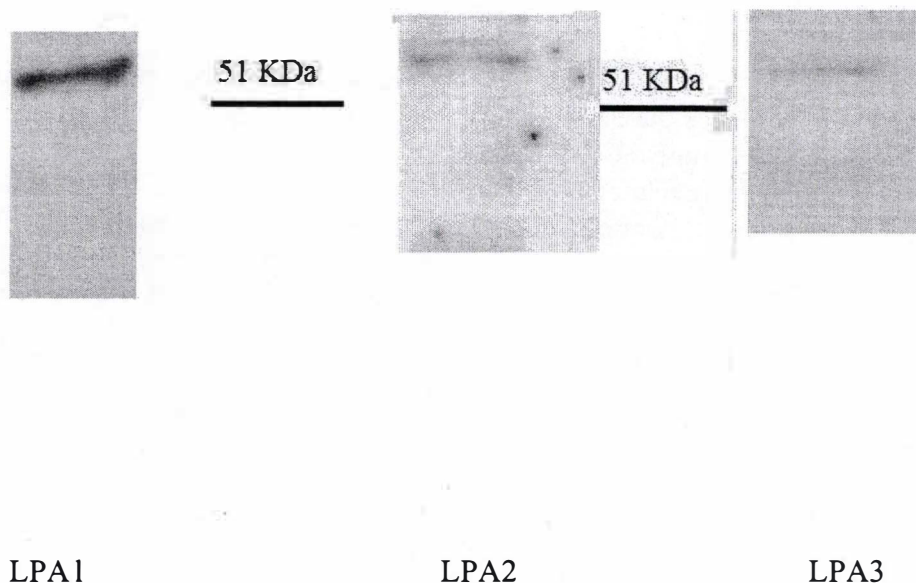


Figure III.4: Mise en évidence de la présence des récepteurs membranaires LPA1, LPA2 et LPA3 à partir d'extraits protéique totaux obtenus de cellules endothéliales. A partir d'une dilution 1:13.000 de l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-LPA1 et une dilution 1:250.000 de l'anticorps secondaire selon le nouveau protocole, nous obtenons une seule bande aux environs de 51 KDa. Les résultats pour le LPA2 et LPA3 proviennent de la figure III.2, l'anticorps primaire polyclonal de lapin fut dilué 1:5.000 et l'anticorps secondaire 1:100.000.

	Conditions testées	
Solution de blocking	TBS + 0,1 % Tween + 2 % lait Amersham	
Volume pour le blocking	De 10 à 25 ml	
	Dilutions Anticorps primaire/secondaire	Temps d'exposition
LPA1	1:5.000 / 1:200.000 1:7.000 / 1:250.000 1:13.000 / 1:250.000	3 à 5 minutes
LPA2	1:5.000 / 1:200.000 1:3.000 / 1:250.000 1:4.000 / 1: 250.000 1: 8.000/1 200.000	10 à 40 minutes
LPA3	1: 5.000 / 1:200.000 1: 3.000 / 1:250.000 1:3.000 / 1:100.000 1:3.000 / 1:200.000 1:4.000 / 1:250.000 1:8.000 / 1:200.000 1:20.000/ 1:200.000	10 à 60 minutes
Volumes des lavages	10 à 25 ml	
Temps d'incubation avec les anticorps secondaires	45 minutes et une heure	
Divers	Agitation sur rouleaux pendant 5 minutes des tubes contenant la solution de blocking et l'Ac avant l'incubation avec les membranes Blocking: 2 heures ou toute la nuit Anticorps primaire: déposé deux heures ou toute la nuit	

Tableau III.1: Description des différents paramètres testés lors de la mise point du nouveau protocole de western blot visant à mettre en évidence la présence des récepteurs au LPA sur des cellules endothéliales. Les deux derniers point de la ligne "divers" ne concernent que le récepteur LPA3.



Figure III.5 : Mise en évidence de la présence du récepteur nucléaire PPAR γ à partir d'extraits protéiques nucléaires obtenus à partir de cellules endothéliales. L'anticorps polyclonal de lapin anti-PPAR γ 1 a été dilué 1:30.000 dans la solution de blocking TBS-T 0,1 %, 5 % Gloria. La membrane a été incubée durant 2 heures à température ambiante sur rouleaux. L'anticorps secondaire monoclonal de chèvre a été dilué 1:100.000 dans la solution de blocking et mis en présence de la membrane durant une heure sur rouleaux à température ambiante.

L'avantage du lait Amersham est qu'il est dégraissé et permet donc d'éviter les absorptions hydrophobes sur la membrane. Cela permet aussi de diminuer la quantité d'anticorps à utiliser et donc par la même occasion de diminuer les coûts mais aussi de privilégier l'interaction spécifique antigène-anticorps primaire.

Nous avons de nouveau testé différentes conditions reprises au **tableau III.1**.

Les meilleurs résultats obtenus concernent le récepteur LPA1.

Suite à tous les tests réalisés, il en résulte qu'une dilution 1:13.000 de l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-LPA1 permet de réduire de façon considérable le bruit de fond et tout en ne faisant apparaître que la bande d'intérêt et ce après un temps d'exposition de trois minutes. Lorsqu'on compare les **figures III.2 et III.4**, on voit bien que le nouveau protocole appliqué aux western blots de LPA1, donne de meilleurs résultats avec peu de bruit de fond, peu de bandes parasites et une bande nette pour LPA1, et ce en diluant plus les anticorps (1:13.000 au lieu de 1:5.000 pour l'anticorps primaire et 1:250.000 au lieu de 1:100.000 pour l'anticorps secondaire).

Il n'en va malheureusement pas de même pour les LPA2 et LPA3. De tous les essais menés, il apparaît que l'ancien protocole a fourni les meilleurs résultats pour ces récepteurs. Des dilutions 1:5.000 de l'anticorps primaire de lapin anti-LPA2 et 1:100.000 de l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase semblent être les plus efficaces. Enfin, le nouveau protocole nous a causé beaucoup de problèmes concernant le récepteur LPA3, l'importance du bruit de fond observé et des bandes parasites dans ce nouveau protocole (résultats non montrés), nous permet de suspecter des problèmes de qualité de l'anticorps primaire. Il apparaît dès lors important de commander un anticorps provenant d'une autre firme et de tester à nouveau les différentes dilutions.

III.1.3 Expression de PPAR

Il fallait également vérifier que le modèle des cellules EAhy926 pouvait exprimer l'isoforme γ des récepteurs inducteurs de la prolifération des peroxydases: PPAR γ . Cindy Gustin nous a fourni le Western Blot qu'elle avait réalisé à partir d'extraits nucléaires. L'anticorps primaire polyclonal de lapin est dirigé contre la séquence 6-105 d'acides aminés de la portion N-terminale du récepteur PPAR γ d'origine humaine. Il a été dilué 1:30.000 dans une solution TBS-T 0,1 % + 5 % Gloria. L'anticorps secondaire monoclonal de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase a pour sa part été dilué 1:100.000 selon l'ancien protocole. Nous observons bien une bande aux environs de 51 KDa (**figure III.5**) et donc la confirmation que le type cellulaire exprime bien le récepteur nucléaire PPAR γ .

Ayant vérifié que les récepteurs membranaires et nucléaires au LPA étaient exprimés, nous pouvons maintenant passer à l'étude des voies de transduction activées par cette molécule à l'aide des systèmes rapporteurs dans le modèle cellulaire EAhy926. L'objectif majeur de ce mémoire sera de déterminer si le LPA est bien un ligand de PPAR γ , comme décrit par MacIntyre et al (2003) pour des cellules monocytaires.

III.1.4 Mise au point des conditions de transfection

Pour vérifier si le LPA est bien un agoniste de PPAR γ , nous devons transfecter les cellules endothéliales EAhy926 avec un plasmide rapporteur comportant plusieurs motifs PPRE (voir paragraphe II.1 et **figure II.3 suite**). Mais les cellules endothéliales sont connues pour être très récalcitrantes à la transfection, c'est pourquoi des mises au point s'avèrent nécessaires avant de passer à l'étude de nos systèmes d'intérêts. Pour faire les mises au point, nous avons préféré recourir à des plasmides rapporteurs répondant à des signaux puissants tels que le plasmide pNF κ B-Luc, dont l'expression est fortement induite en présence par exemple de

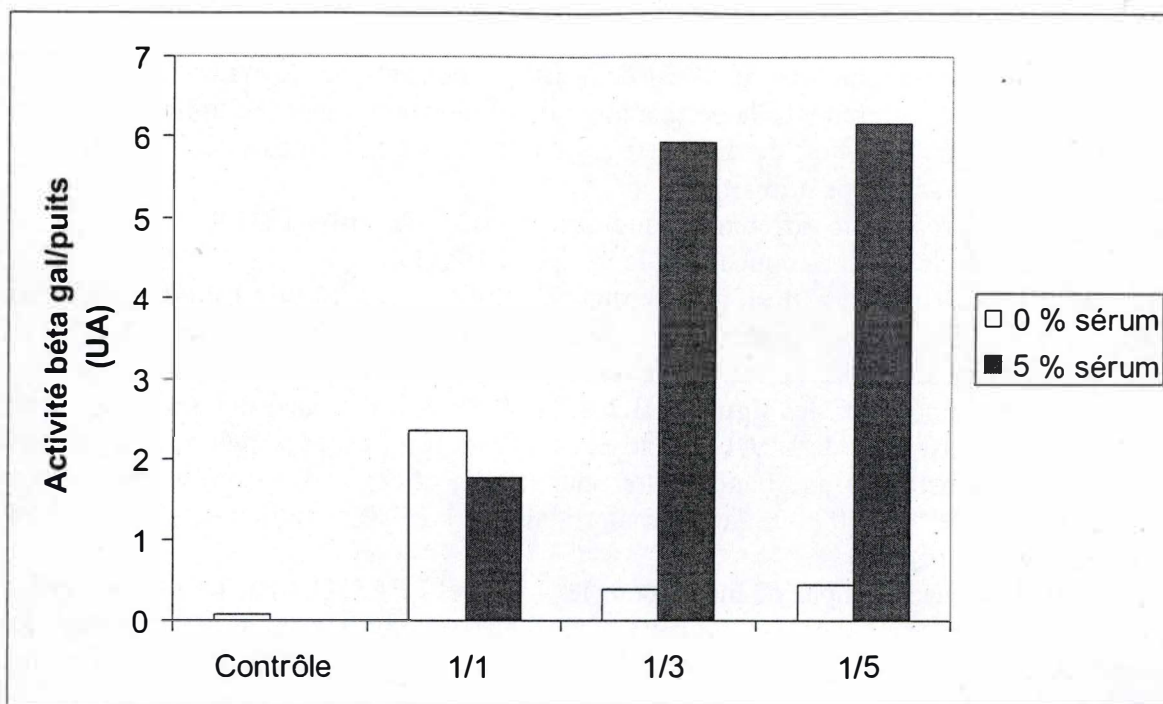
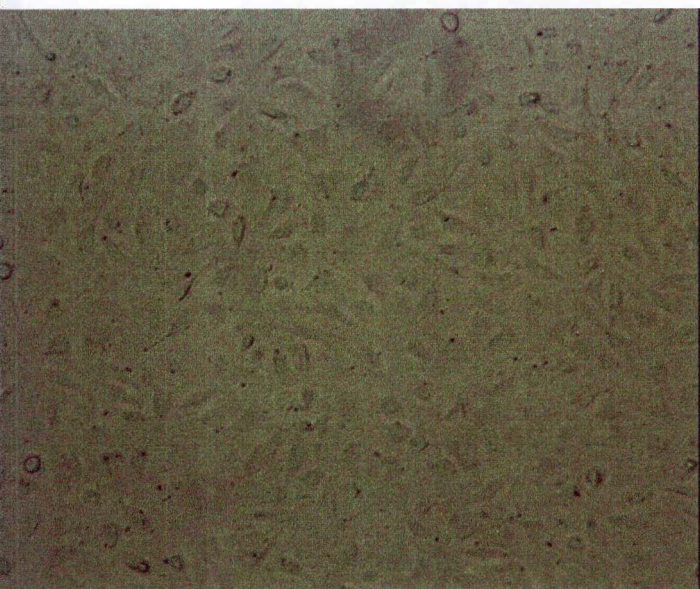
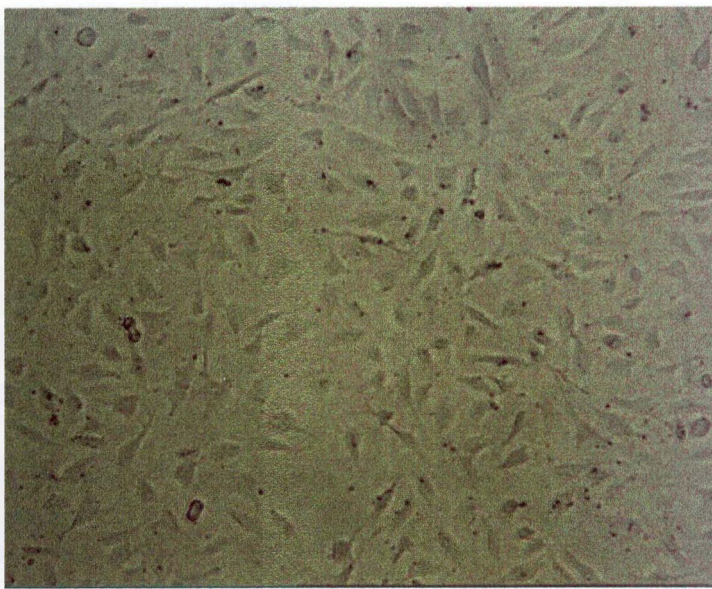


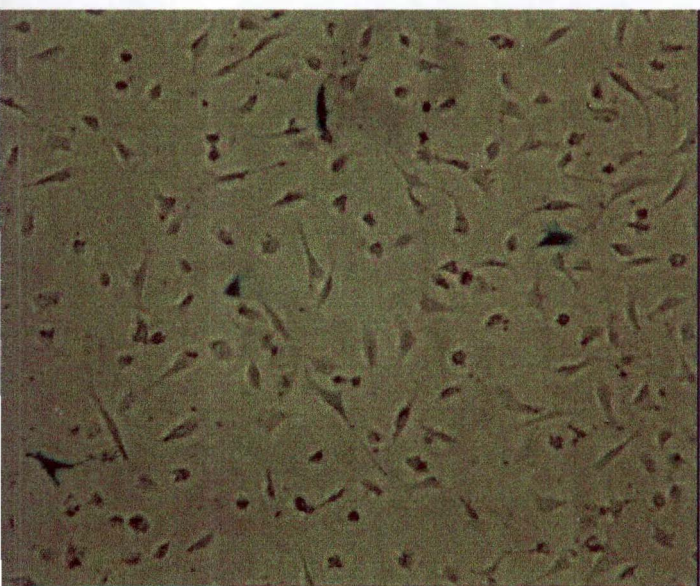
Figure III.6: Révélation de l'activité β -galactosidase des cellules transfectées avec pCMV- β en présence ou non de sérum. Les cellules sont repiquées la veille de la transfection pour atteindre une densité de 125.000 cellules dans des puits de 3,82 cm². Le plasmide pCMV- β est à une concentration finale de 1,5 μ g par puits. Ce plasmide possède un promoteur fort CMV en amont du gène Lac codant pour l'enzyme β -galactosidase. Pour la formation des complexes, un certain volume de Superfect est ajouté selon le ratio désiré durant 15 minutes. Les cellules sont incubées ensuite durant 3 heures dans un milieu contenant les plasmides et composé d'Optimen, avec ou sans sérum. L'histogramme représente l'activité β -galactosidase exprimée en unités arbitraires (uA). Les valeurs obtenues à 405 nm ont été multipliées par le facteur de dilution du lysat (3X). L'abscisse représente les différents ratios ADN/Sf testés en présence de sérum ou non.



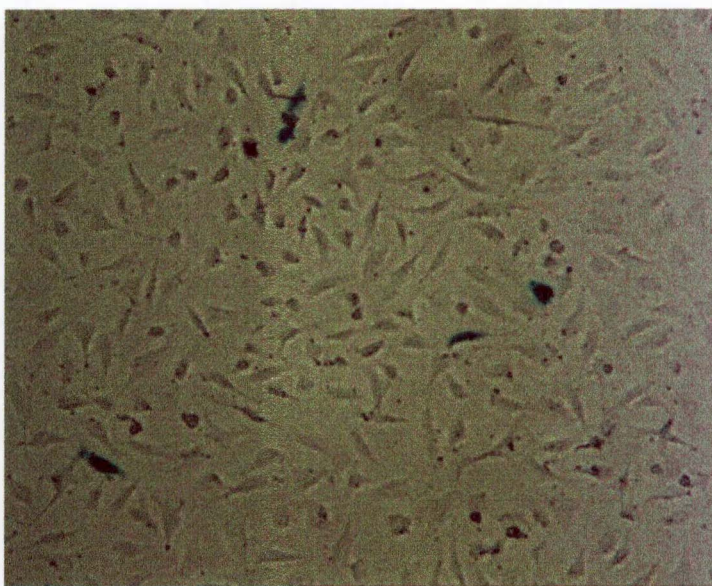
Contrôle sans sérum



Contrôle 5 % sérum

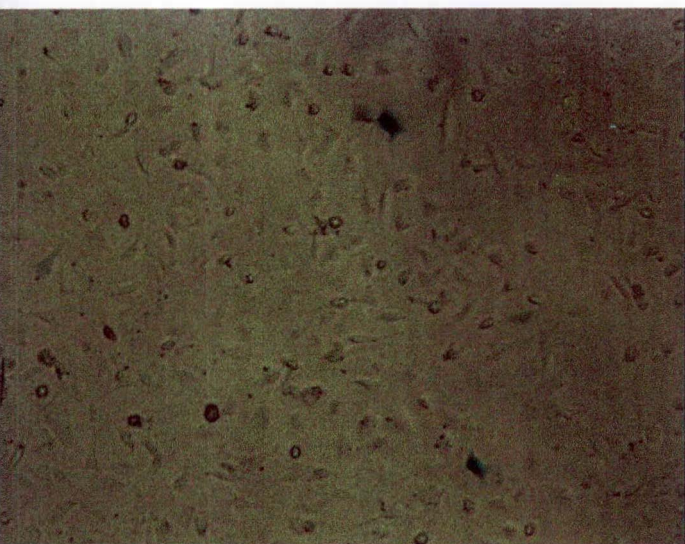


ADN/Sf 1/1 sans sérum

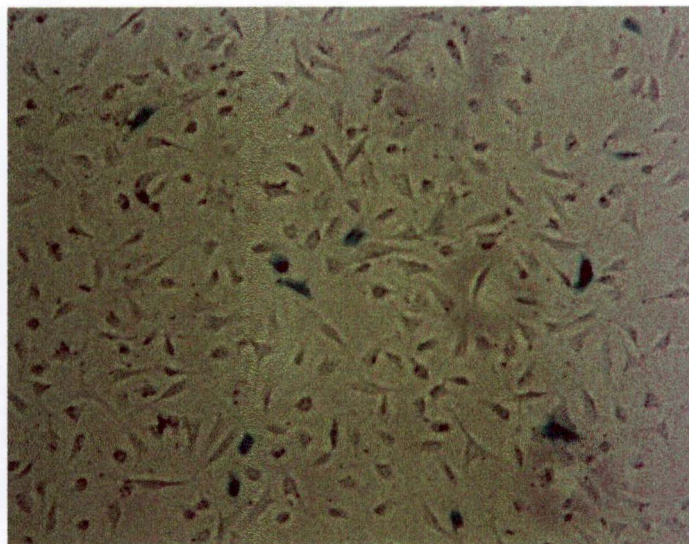


ADN/Sf 1/1 5 % sérum

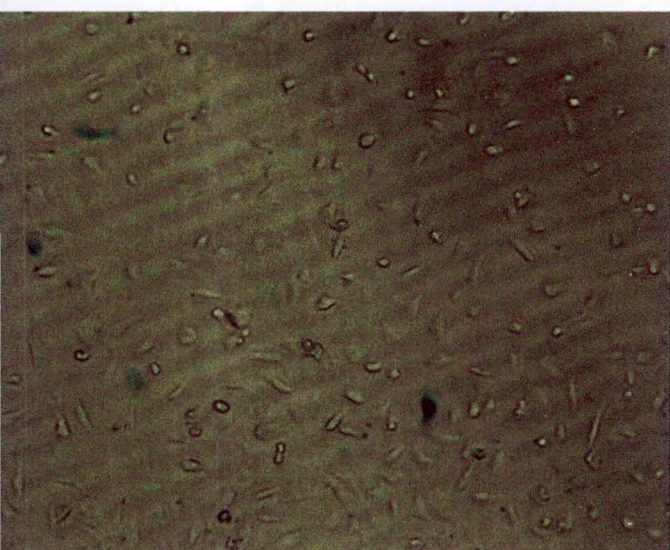
Figure III.7 : Révélation cytochimique de l'activité β -galactosidase de cellules transfectées avec le pCMV β suivant un ratio ADN/SF de 1/1 , 1/3, 1/5 dans un milieu de transfection contenant 0 ou 5 % de sérum.



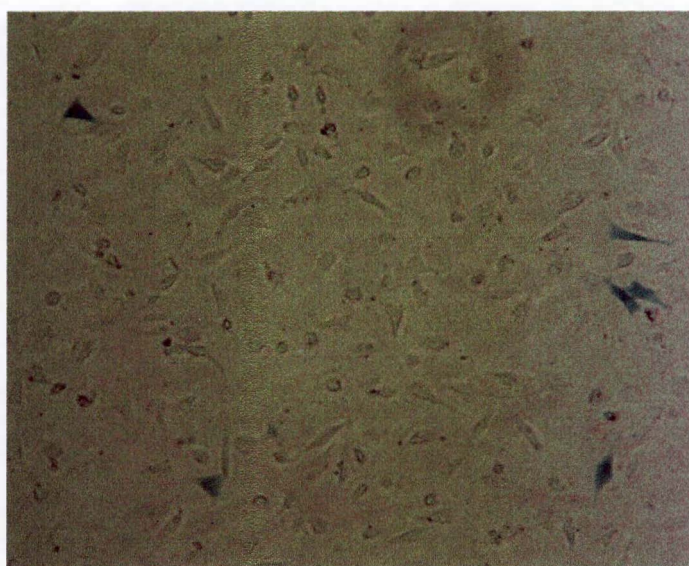
ADN/Sf 1/3 sans sérum



ADN/SF 1/3 5 % sérum



ADN/Sf 1/5 sans sérum



ADN/Sf 1/5 5 % sérum

Figure III.7 suite : Révélation cytochimique de l'activité β -galactosidase de cellules transfectées avec le plasmide pCMV β suivant un ratio ADN/SF de 1/1, 1/3, 1/5 dans un milieu de transfection contenant 0 ou 5% de sérum.

Rapport ADN/Sf	Efficience de transfection en %	
	+ sérum 5 %	Sans sérum
1/1	2 %	3 %
1/3	5,5 %	3 %
1/5	6,5 %	5 %

Tableau III.2: Estimation de l'efficience de tranfection par cytochimie.

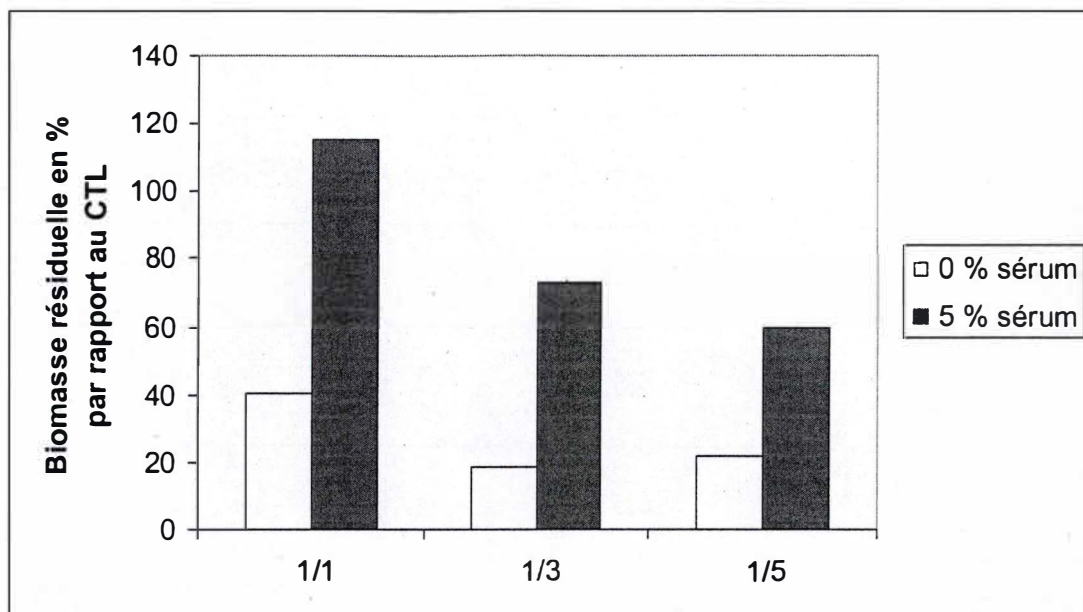


Figure III.8: Viabilité cellulaire estimée par la biomasse résiduelle suivant les différentes conditions de transfections. L'ordonnée représente le pourcentage de survie cellulaire par rapport aux contrôles. L'abscisse représente les différents ratios ADN/Sf testés dans un milieu de transfection composé de 5 % ou 0 % de sérum. A partir du lysat utilisé pour le test colorimétrique, un test de Bradford est réalisé en parallèle.

TNF α ou encore le pAP1-Luc, dont l'expression est fortement induite en présence de PMA + ionomycine, généralement utilisés comme condition stimulatrice.

Les paramètres importants lors d'une transfection sont le ratio ADN/ agent de transfection, représentant la quantité en μg d'ADN de plasmide par rapport au volume de l'agent de transfection. Ce ratio définit la charge totale du complexe ADN/Sf. Il faut donc pour optimiser la liaison du complexe à la membrane cellulaire que la charge globale des complexes soit légèrement positive. Un deuxième paramètre est le temps d'incubation des cellules avec les complexes et le milieu de transfection. Enfin, la densité cellulaire au moment de l'addition des complexes peut influencer l'efficacité de transfection. On conseille généralement de travailler avec des cellules pré-confluentes.

III.1.4.1 Essais préliminaires de transfection simple avec le plasmide pCMV- β

Au sein du laboratoire, Aurélie Tacheny et Martine Van Steenbrugge avaient déjà mis au point des conditions préliminaires de travail. Sur base de leurs conseils, nous avons donc choisi de travailler avec 1,5 μg d'ADN plasmidique et d'utiliser le Superfect comme agent transfectant. Ce polymère cationique de type dendrimère, chargé positivement, est relativement facile d'usage. Il est utilisé couramment au laboratoire avec divers types cellulaires.

Nous avons repiqué les cellules la veille de l'expérience suivant le protocole II.1.2.1 de façon à atteindre une densité de 125.000 cellules par puits. Pour mettre au point les conditions de transfection, nous avons utilisé le plasmide pCMV- β . Ce plasmide possède le promoteur fort du cytomégalo virus (CMV) lui permettant d'exprimer fortement le gène en aval. Ce gène (Lac) code pour la β galactosidase d'E. coli, enzyme catalysant la dégradation des sucres β -galactosides, ce qui en présence du substrat X-gal donne un produit de coloration bleue. L'accumulation du produit réactionnel peut être suivie en colorimétrie et en cytochimie. Dans ce dernier cas, nous pouvons donc estimer le pourcentage des cellules transfectées.

Les paramètres testés ont été le ratio ADN/Sf (1/1; 1/3; 1/5) et l'incubation des complexes en présence ou non de sérum dans un milieu contenant de l'Optimen.

La transfection proprement dite a lieu durant 3 heures à 37° C dans une atmosphère à 95 % d'humidité et 5 % de CO₂. Les cellules récupèrent par la suite dans 1 ml de milieu complet composé pour rappel de DHG + 10 % sérum + antibiotiques pendant 24 heures.

Pour toutes les conditions, 4 plaques sont prévues: deux pour l'analyse colorimétrique et deux qui serviront à révéler l'efficacité de transfection par un test cytochimique. Enfin trois puits par plaques ne recevront pas de plasmide et serviront de contrôles afin de détecter une éventuelle activité β -galactosidase intrinsèque et de tester la toxicité des conditions.

Le lendemain de la transfection, nous avons procédé à la révélation colorimétrique des plaques concernées. Les résultats de ce test se trouvent à la **figure III.6**. Les valeurs d'absorbance à 405 nm ont été multipliées par le facteur de dilution du lysat (3X). L'activité est exprimée en unités arbitraires en fonction des différents ratios testés, et ce en présence ou non de sérum. Nous observons que deux rapports se démarquent (1/3 et 1/5) et ce en présence de sérum. Nous avons également dans la même expérience estimée l'efficacité de transfection par cytochimie (**figure III.7**).

En faisant le rapport entre le nombre de cellules bleues et le nombre total de cellules dans la population, nous pouvons estimer le pourcentage d'efficacité de transfection. Ces pourcentages sont renseignés dans le **tableau III.2**. En cytochimie, nous remarquons également que les rapports 1/3 et 1/5 donnent des efficacités semblables et ce également en présence de sérum. Nous avons également estimé la viabilité des cellules pour chaque condition et l'avons comparée aux contrôles. Cela a été possible par la méthode de Bradford en considérant que la quantité de protéines restant dans les puits contrôles correspondaient à un taux de viabilité de 100 %. Les résultats obtenus sont donnés à la **figure III.8**. Tout

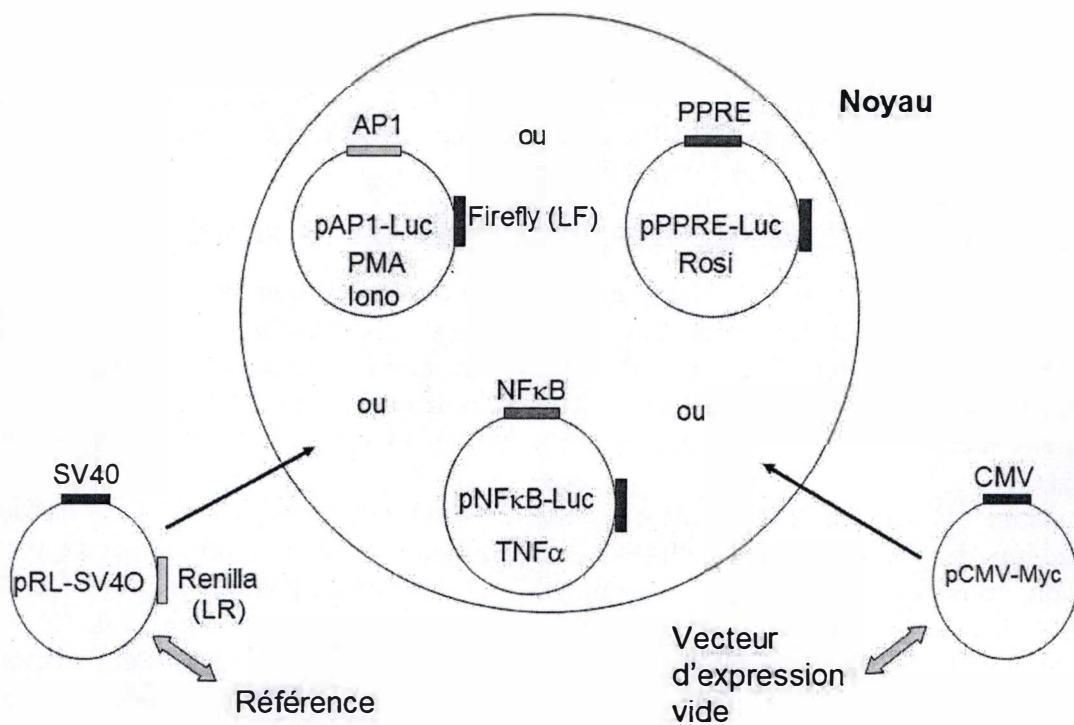


Figure III.9: Schéma représentant le principe de la triple transfection avec des plasmides rapporteurs . Les cellules sont transfectées avec trois plasmides: un plasmide inductible (pAP1-Luc ou pPPRE-Luc ou pNFκB-Luc), un plasmide de référence (pRL-SV40) et un vecteur d'expression vide (pCMV-Myc). Les cellules transfectées avec pAP1-Luc seront stimulées au PMA + Ionomycine, celles qui reçoivent pPPRE-Luc avec la rosiglitazone et celles qui sont transfectées avec pNFκB-Luc seront stimulées avec le TNF α . Ces systèmes "classiques" permettront de savoir si le système étudié est fonctionnel dans nos conditions expérimentales. LF= luciférase "firefly" LR= luciférase "Renilla"

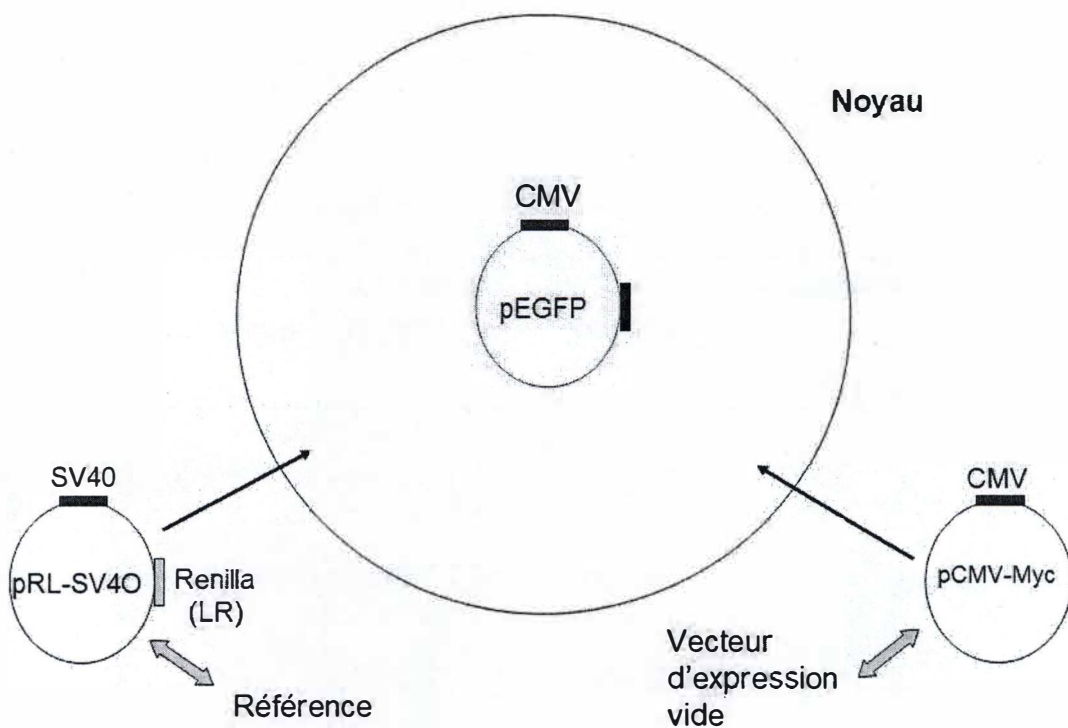


Figure III.10: Schéma représentant le principe de la transfection avec le remplacement des plasmides inductibles par un plasmide (pEGFP-N1) dont l'expression est facilement quantifiable. Ce plasmide code pour la "Enhanced Green Fluorescent Protein". Il possède un promoteur fort CMV. Excitée dans le bleu, la GFP émet dans le vert. Le taux d'efficacité de transfection se mesure par nano-cytométrie de flux avec le bioanalyseur 2100 Agilent. LR=Renilla.

Plasmide Expérience	pEGFP	pRL-SV40	pCMV-Myc
A	3,84/50	7,69/50	38,4/50
B	1,92/50	7,69/50	40,32/50
C	3,84/50	11,52/50	34,56/50

Tableau III.3: Trois expériences ont été faites à partir des plasmides pEGFP-N1, pRL-SV40 et pCMV-Myc. Pour chacune d'elles, la proportion de chaque plasmide au sein de la cellule varie.

d'abord, nous constatons que la transfection des cellules en l'absence de sérum réduit fortement la viabilité cellulaire, quelle que soit le ratio ADN/Sf. En présence de sérum 5 %, la survie est de +/- 73 % pour le ratio 1/3 et de +/- 60 % pour le ratio 1/5.

Etant donné que les efficacités de transfection étaient comparables pour les ratios 1/3 et 1/5, nous opterons pour le rapport le moins cytotoxique et donc pour le ratio 1/3 en présence de sérum. Bien que les efficacités de transfection restent faibles, ces résultats préliminaires étaient encourageants et nous avons tenté de travailler dans des conditions expérimentales plus adéquates, en lançant des transfusions triples.

III.1.4.2 Essai de transfection triple

Pour les transfusions triples, nous avons utilisé trois types de plasmides: un plasmide inductible, un plasmide de référence et un vecteur d'expression vide. Les plasmides inductibles possèdent des éléments enhanceurs spécifiques qui consistent en des répétitions de séquence consensus propre aux facteurs de transcription étudiés: ce sont les plasmides pAPI-Luc pour API, pPPRE-Luc pour PPAR et pNFκB-Luc pour NFκB. Ces différents plasmides répondent à une stimulation par l'expression d'un gène en aval de ces éléments: le gène de la luciférase "Firefly". L'oxydation en présence d'ATP, de Mg^{++} , d' O_2 et de la luciférase, conduit à la formation d'oxyluciférine accompagnée d'une émission de photons.

Le plasmide de référence possède pour sa part le promoteur fort du virus simien 40 (SV40) et porte en aval de celui-ci le gène de la luciférase "Renilla". En présence d' O_2 , la luciférase voit la coéluentérazine convertie en coéluentéramide avec émission de photons. Ce plasmide sert à normaliser l'activité luciférase "Firefly" des plasmides inductibles.

Enfin le troisième plasmide vide a été choisi dans le but d'envisager plus tard l'insertion par exemple de mutants dominants négatifs grâce à la présence d'un site de clonage multiple. Un schéma représentant le choix du système rapporteur est fourni à la **figure III.9**.

Triple transfusions avec la GFP comme système rapporteur

Cependant, nous ne savons pas dans quelle mesure la cellule incorporera les trois plasmides. De plus, il reste encore à déterminer dans quelles proportions relatives les trois plasmides doivent être complexés au superfect. C'est pourquoi nous avons dans un premier temps remplacé les plasmides inductibles par un plasmide dont l'expression est facilement quantifiable: le pEGFP-N1. En effet, l'utilisation d'un microscope à fluorescence ou du système Agilent permet de visualiser ou de quantifier par nano-cytométrie de flux, l'efficacité de transfection. Nous avons donc procédé à une triple transfection avec le plasmide pEGFP-N1, le plasmide de référence pRL-SV40 et le vecteur d'expression vide pCMV-Myc représenté à la **figure III.10**. Les différents rapports de plasmides testés sont indiqués au **tableau III.3**. Le ratio ADN/Sf est de 1/3, la transfection se déroulera durant 3 heures dans un milieu Optimen + 5 % sérum. L'expression de la EGFP est déterminée 24 heures après la transfection.

Le principe du système Agilent consiste en premier lieu à déterminer le nombre total d'événements, c'est-à-dire le nombre de cellules ayant incorporé la sonde cBNF, sonde pouvant être incorporée par toutes les cellules vivantes (les détails du protocole sont fournis dans le matériels et méthodes au point II.3.2.2). Elle émet à une longueur d'onde située dans le rouge à 675 nm en réponse à une excitation à 595 nm. Ensuite le nombre de cellules exprimant la EGFP est déterminé en mesurant l'émission de lumière verte, après excitation dans le bleu. En faisant le rapport entre le nombre de cellules exprimant la EGFP et le nombre total d'événements, nous obtenons l'efficacité de transfection pour chaque rapport.

Nous avons en parallèle mesuré la toxicité de ces conditions grâce au test de réduction du MTT. Son principe se base sur le fait que des cellules biologiquement actives incorporent le MTT et le clivent en un produit insoluble en milieu aqueux et de coloration mauve. En

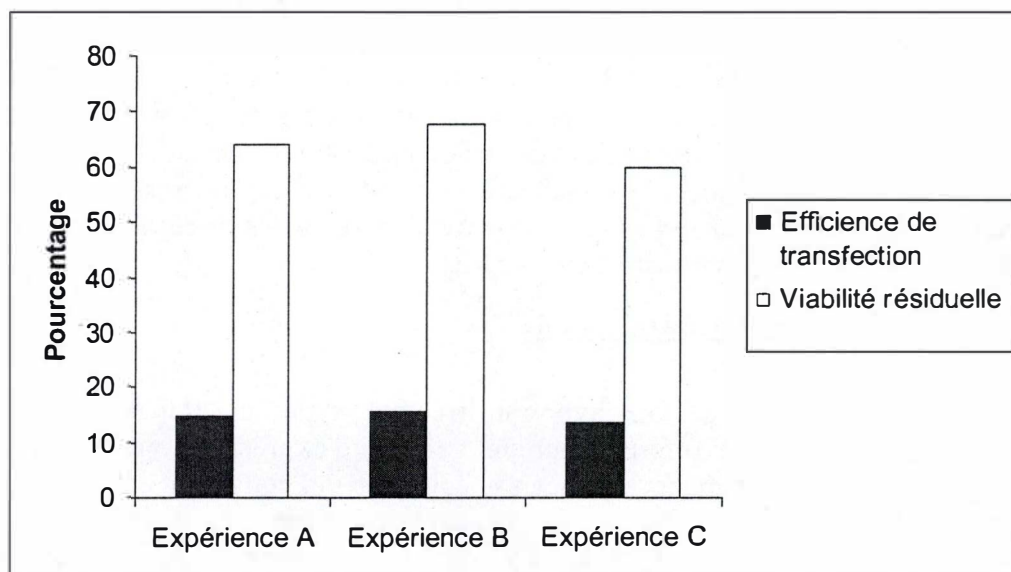


Figure III.11: L'histogramme représente d'une part l'efficacité de transfection pour chacune des conditions testées (colonnes grises) et d'autre part la viabilité des cellules exposées aux diverses conditions de transfections suivant les différents rapports (colonnes blanches). L'efficacité de transfection a été mesurée grâce aux bioanalyseur 2100 Agilent tandis que la viabilité cellulaire a été mesurée par un test d'incorporation et de réduction du MTT. Elle est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non transfectées. Les cellules ont été transfectées avec le plasmide pEGFP-N1, le plasmide de référence pRL-SV40 et le vecteur d'expression vide pCMV-Myc selon différents rapports décrits au tableau III.3.

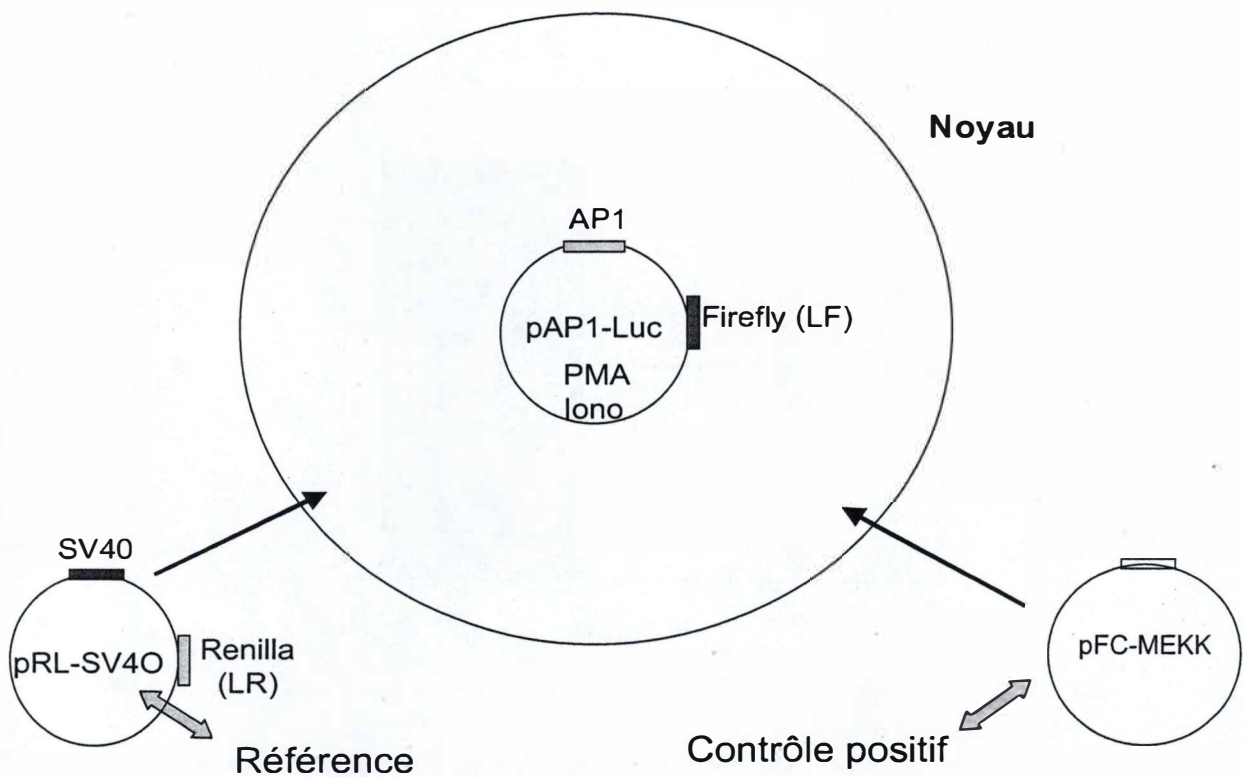


Figure III.12 : Schéma illustrant le principe d'une triple transfection où l'expression du plasmide pFC-MEKK, permet l'activation d'AP-1 et donc l'expression de la luciférase sans qu'il n'y ait stimulation des cellules par un stimulus exogène. Les cellules sont donc transfectées avec le plasmide inductible pAP1-Luc, avec pRL-SV40, le plasmide de référence et pFC-MEKK, le contrôle positif. La proportion de chaque plasmide dans la cellule est respectivement de 46,5/50, de 1/50 et 2,5/50.

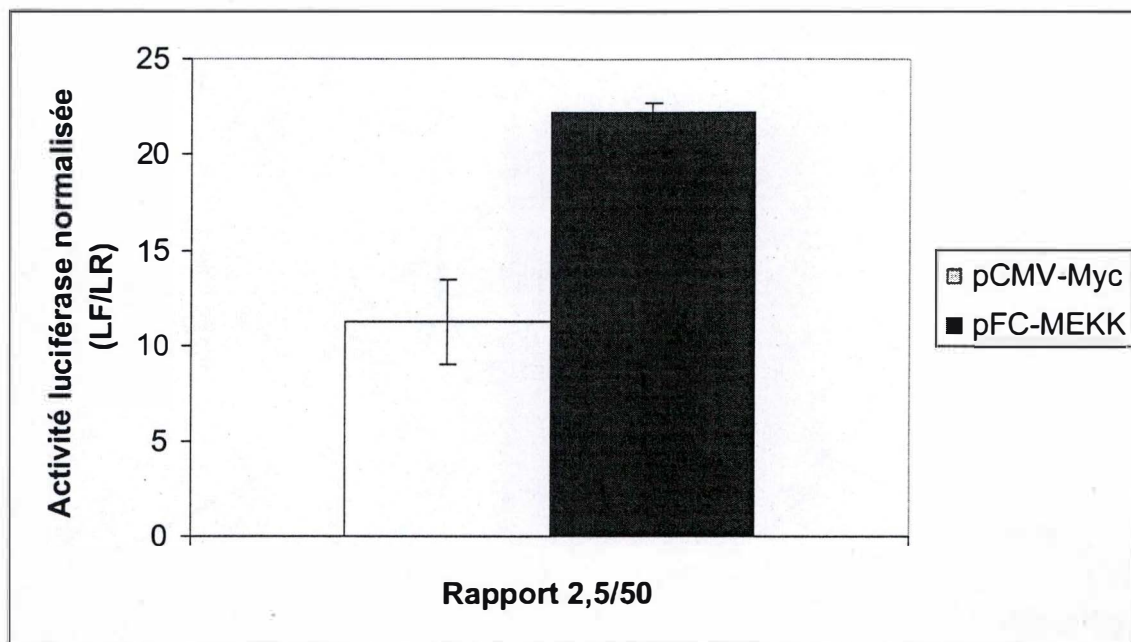


Figure III.13: Révélation de l'activité luciférase normalisée (LF/LR) suite à une transfection avec le contrôle positif pFC-MEKK. La colonne claire représente les cellules qui n'ont pas été transfectées avec le contrôle positif, mais avec le vecteur d'expression vide. La colonne foncée représente les cellules transfectées avec pFC-MEKK. Le mode de révélation grâce au kit Dual luciférase de Promega, est expliqué au point II.3.2.3. Les données correspondent à la moyenne de triplicats +/- écart type

mesurant l'absorbance à 570 nm, il est alors possible de déterminer le nombre de cellules vivantes étant donné l'existence d'une corrélation entre le nombre de cellules vivantes et le nombre de molécules de MTT réduites. Ce test nous a semblé plus adéquat qu'une simple mesure de la biomasse résiduelle.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogramme à la **figure III.11** avec l'efficacité de transfection (colonnes grises) ainsi que le pourcentage de viabilité cellulaire (colonnes blanches) en fonction des différents rapports de plasmides testés.

Nous remarquons que les trois conditions de triple transfection donnent des résultats similaires aussi bien pour l'efficacité de transfection qui se situe aux environs de 15 % que pour la viabilité des cellules proches de 60 %. Nous pouvons conclure dans un premier temps que les conditions de triple transfection induisent une certaine cytotoxicité, mais celle-ci reste acceptable. D'autres travaux du laboratoire, en transfection simple sur les cellules Cos (de singe), révèlent des toxicités comparables avec le Sf. Par ailleurs, nous obtenons une efficacité de transfection pour la EGFP proche des 15 %, ce qui constitue un résultat plus qu'encourageant pour des cellules endothéliales.

Triple transfection avec le système des luciférases "Firefly"/ "Renilla"

La fluorescence est un moyen simple de suivre la transfection mais au laboratoire, les plasmides rapporteurs inducibles sont tous de type luciférase. C'est pourquoi nous allons revenir aux systèmes de départ "Firefly/Renilla" illustrés à la **figure III.9**.

Nous allons d'abord vérifier que le système pouvait répondre à une stimulation par des facteurs de transcription activés en testant un contrôle positif (pFC-MEKK) fourni par la firme Stratagene. Ce plasmide code pour une MEK kinase sous contrôle d'un promoteur fort, son rôle est d'activer les différents facteurs de transcription étudiés se trouvant en aval de la voie des MAP kinases, tel que AP-1. Dans ces conditions, les cellules ne doivent pas être stimulées par le cocktail PMA + ionomycine. Ce système est schématisé à la **figure III.12**. Nous avons procédé à une triple transfection avec le plasmide inducible pAP1-Luc, le plasmide de référence pRL-SV40 et le contrôle positif pFC-MEKK. En parallèle, nous avons réalisé une triple transfection avec le vecteur d'expression vide à la place du contrôle positif, ceci nous permettant d'avoir un contrôle négatif. Les rapports utilisés pour les plasmides pRL-SV40, pAP1-Luc et soit pCMV-Myc ou pFC-MEKK sont respectivement de 1/50, 46,5/50 et 2,5/50 pour une quantité totale de 1,5 µg d'ADN. Le ratio ADN/Sf utilisé est de 1/3 et le milieu de transfection est toujours de l'Optimem + 5 % sérum.

Les résultats sont donnés sous forme d'histogramme à la **figure III.13**. Ils représentent l'activité luciférase normalisée (LF/LR) en fonction du type de contrôle (contrôle positif ou négatif). Nous observons une expression de la luciférase inducible lorsque la cellule est co-transfectée avec le contrôle positif, double par rapport à une cellule transfectée avec pCMV-Myc. Cette première expérience nous permet de conclure que le système de triples transfusions est fonctionnel et que les proportions entre plasmides étaient bien choisies. Signalons cependant que les signaux obtenus pour la luciférase "firefly" sont très faibles (< 500 RLU) par rapport aux signaux luciférase "Renilla".

Nous avons alors continué l'étude à partir des plasmides inducibles d'intérêt et plus précisément de pAP1-Luc, cette fois-ci en stimulant les cellules avec des molécules activatrices. Nous savons que le système peut répondre à des acteurs de voies de signalisation activées, ce qui nous intéresse maintenant est de voir s'il peut y répondre, lorsque ces "acteurs" ont été activés par la liaison d'un ligand à son récepteur et non plus par l'expression ectopique d'une kinase (pFC-MEK). Nous avons donc travaillé avec des ligands connus pour activer fortement ces voies. Pour pAP1-Luc, le cocktail PMA + ionomycine a été choisi car il sert de contrôle positif pour mesurer l'activation du facteur AP-1, en test colorimétrique de binding.

Plasmide Expérience	pRL-SV40	pAP1-Luc	pCMV-Myc
A	3,84/50	7,69/50	38,4/50
B	2,5/50	7,5/50	37,5/50
C	1/50	9/50	40/50

Tableau III.4: Liste des différents rapports utilisés pour une triple transfection avec le plasmide inductible pAP1-Luc, le plasmide de référence pRL-SV40 et le vecteur d'expression vide pCMV-Myc.

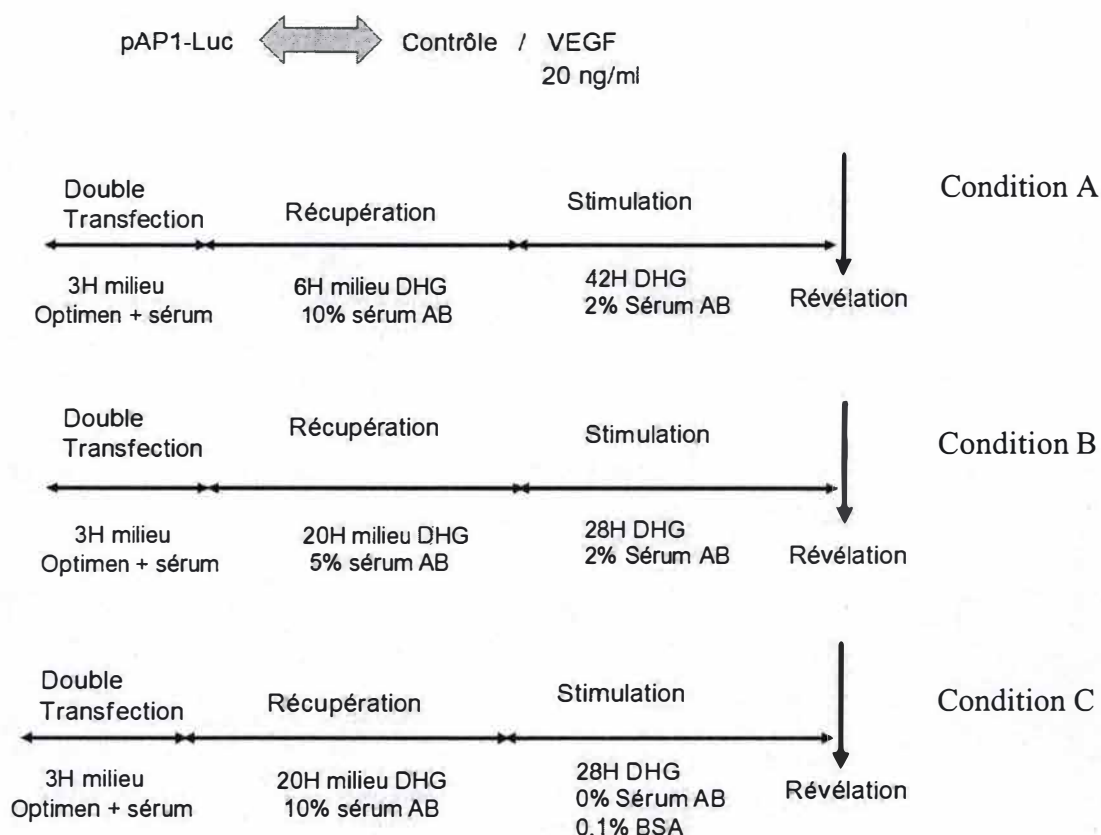


Figure III.15: Protocoles de stimulation avec le VEGF des cellules transfectées avec pAP1-Luc et pRL- SV40. La condition A permet à la cellule de récupérer 6 heures dans un milieu complet (DHG + 10 % sérum + antibiotiques) avant d'être stimulées 42 heures dans un milieu complet ne contenant que 2 % de sérum. La condition B laisse les cellules récupérer pendant 20 heures dans un milieu ne contenant que 5 % sérum avant d'être stimulées 28 heures dans un milieu complet ne contenant que 2 % de sérum. Enfin le temps de récupération de la condition C est de 20 heures dans du milieu complet pour ensuite rincer les cellules avec du DHG + 0,1 % BSA avant de les stimuler dans ce milieu.

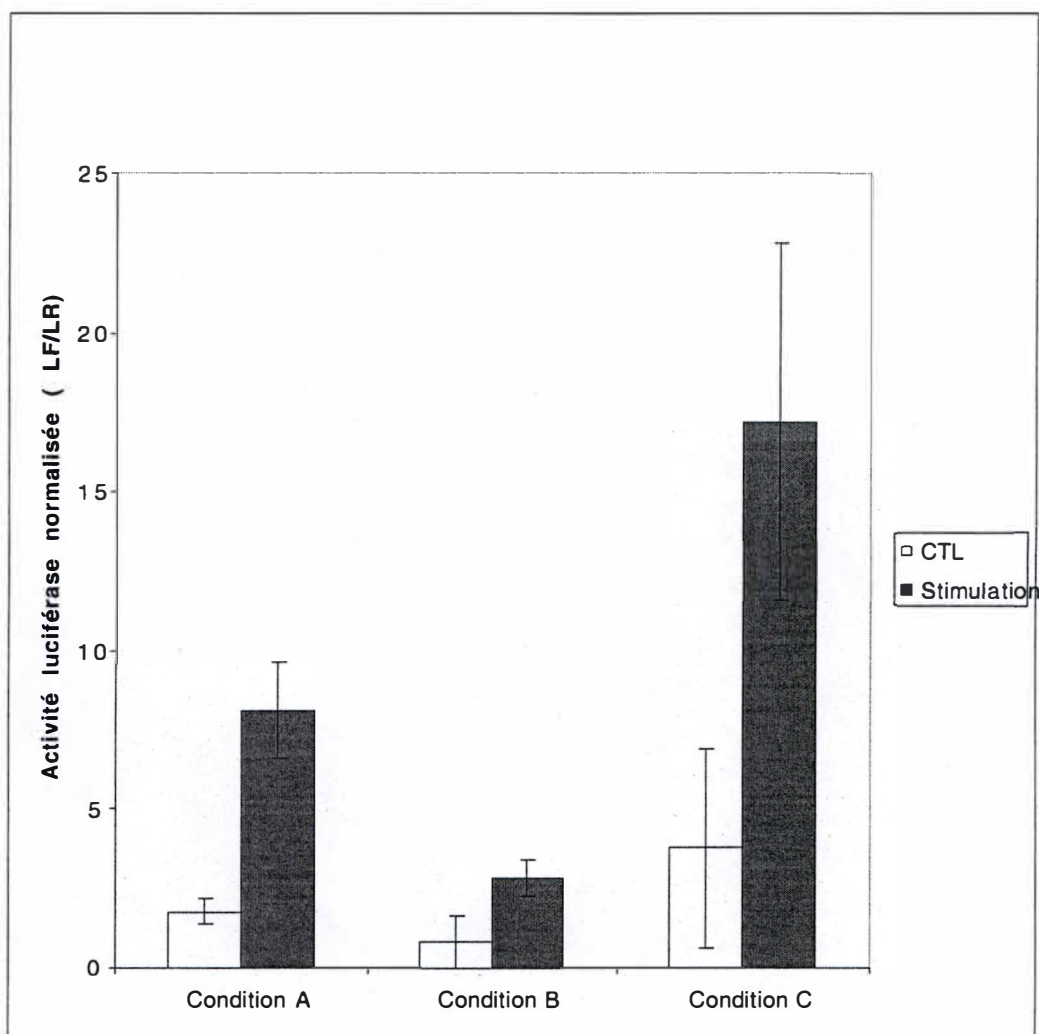


Figure III.16: Révélation de l'activité luciférase normalisée (LF/LR) après double transfection pAP1-Luc / pRL-SV40 (49/50 – 1/50). En ordonnée est représentée l'activité luciférase normalisée. En abscisse sont représentées les différentes conditions de stimulation décrites à la figure III.15. Les données correspondent à la moyenne de triplicats +/- écart type. Pour chaque condition nous avons comparé les cellules contrôle (colonnes claires) et les cellules stimulées (colonnes foncées)

Lors des transfections, les cellules étaient stimulées selon le protocole illustré à la **figure III.14**. Nous avons rincé les cellules trois heures après transfection avec du DHG seul avant de leur rajouter 1 ml de milieu de récupération c'est-à-dire du DHG + 10 % sérum + antibiotiques. Après 24 H, les cellules sont stimulées par ajout de 0,1 µg/ml de PMA et d'ionomycine 1 mM dilués dans le même milieu, dans le cas où pAP1-Luc est utilisé comme système classique. De nouveau, nous avons voulu tester différents rapports de plasmides représentés au **tableau III.4**.

Malheureusement, nous nous sommes heurtés à des problèmes inattendus de cytotoxicité du cocktail PMA + Ionomycine sur ce modèle cellulaire. Cela se reflète d'ailleurs au niveau des signaux luciférase "Renilla" plus faibles que ceux obtenus auparavant et plus irréguliers. De plus, les valeurs obtenues pour la luciférase "firefly" étaient également très faibles. Ces problèmes de cytotoxicité du cocktail PMA + ionomycine ne s'étaient jamais posés lorsque l'on dose l'activation du facteur AP-1 par test trans-AM, car les temps d'incubation sont beaucoup plus courts et ne dépassent jamais 2 heures dans ce type d'expérience.

III.1.4.3 Essais de doubles transfections avec le système des luciférases "firefly"/"Renilla"

Nous avons alors choisi de stimuler les cellules avec une autre molécule: le VEGF. Ce facteur angiogénique est un activateur bien décrit de AP1, dans les cellules endothéliales. Afin d'augmenter encore les signaux "firefly", et de diminuer et stabiliser ceux de "Renilla", nous avons apporté quelques modifications dans le protocole de transfection:

- Nous avons encore augmenté la proportion des plasmides inductibles au détriment du plasmide de référence. Le rapport du plasmide inductible est alors passé de 46,5/50 à 49/50 avec un rapport de 1/50 pour le plasmide de référence, et ce pour les 1,5 µg d'ADN totaux utilisés.
- Nous avons laissé provisoirement de côté le vecteur d'expression vide: pCMV-Myc et nous nous sommes limités à des doubles transfections.
- Trois nouveaux protocoles de stimulation ont été testés, ils sont illustrés à la **figure III.15**. La "condition A" permet aux cellules de récupérer 6 heures dans un milieu DHG + 10 % sérum + antibiotiques pour ensuite être stimulées avec le VEGF pendant 42 heures dans un milieu DHG + 2 % sérum + antibiotiques. La "condition B" laisse les cellules récupérer durant 20 heures dans un milieu DHG + 5 % sérum + antibiotiques, récupération suivie de la stimulation avec le VEGF pendant 28 heures dans un milieu DHG + 2 % sérum + antibiotiques. Enfin, lors de la "condition C", les cellules récupèrent 20 heures dans un milieu DHG + 10 % sérum + antibiotiques, elles sont ensuite rincées dans du DHG seul pour enlever toute trace de sérum avant d'être stimulées 28 heures dans un milieu DHG + 0,1 % BSA **sans sérum** en présence de VEGF. La concentration finale du VEGF pour chaque condition est de 20 ng/ml.

Les résultats présentés à la **figure III.16** illustrent l'activité luciférase "firefly" normalisée (LF/LR) en fonction des conditions de stimulation testées. Au niveau des valeurs brutes, nous avons obtenu des signaux luciférase "Renilla" stables et plus faibles que ceux obtenus pour les expériences précédentes. Ensuite, les signaux luciférase "firefly" ont augmenté permettant d'obtenir une induction de 4,5 X par rapport aux cellules contrôles pour la condition A et C, et de 3,3 X pour la condition B. Les signaux luciférase "firefly" obtenus restent cependant toujours très faibles, ce qui explique sans doute en partie la variabilité observée pour la condition C. Néanmoins, nous continuerons avec la condition C étant donné que c'est celle qui

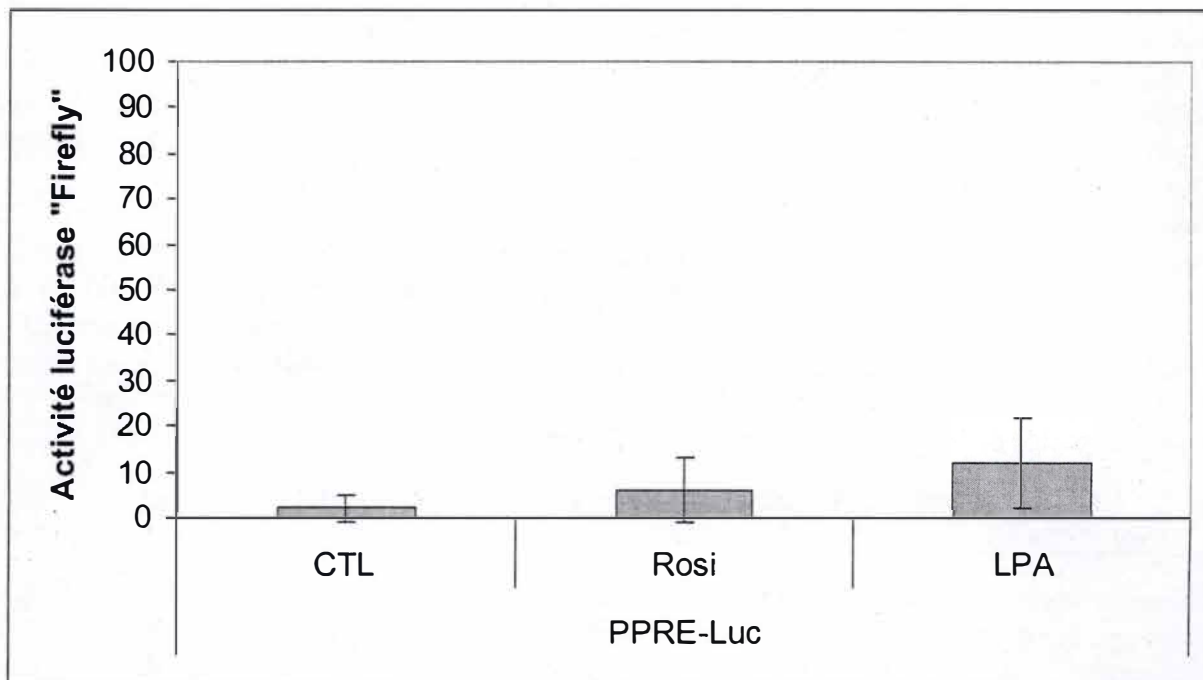
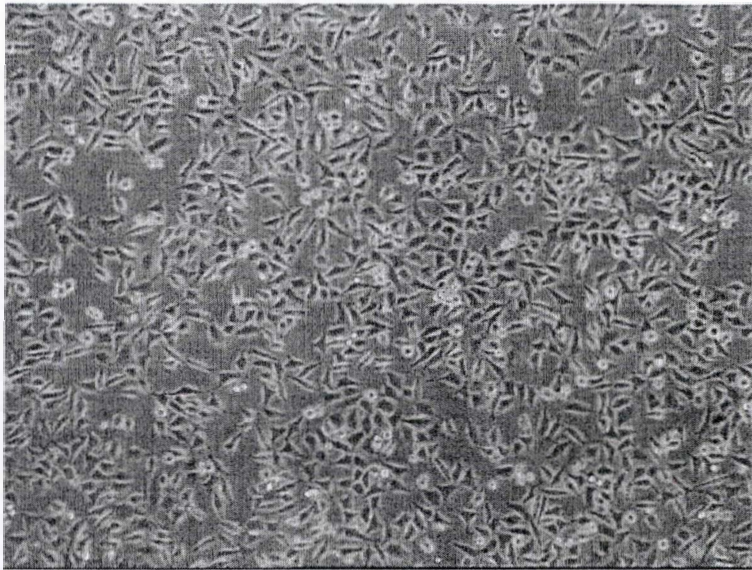
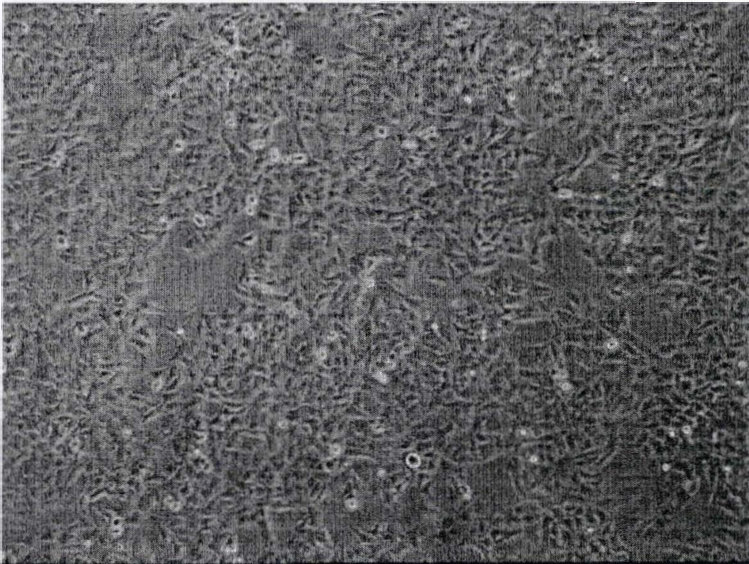


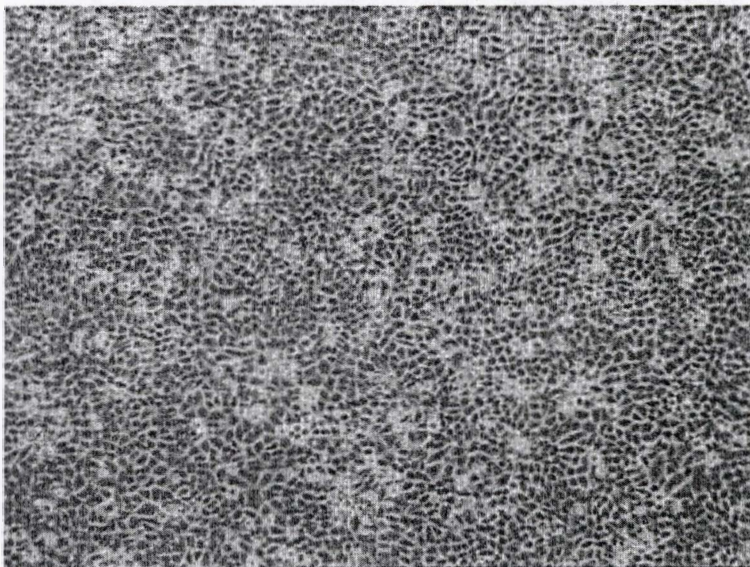
Figure III.17: Transfection simple avec le plasmide pPPRE-Luc sur le modèle de cellules EAhy926. Les cellules sont repiquées la veille suivant une densité de 125.000 cellules par puits, le ratio ADN/Sf utilisé est de 1/3 pour une concentration finale de 1,5 μ g de plasmide par puits. Les cellules sont rincées 3 heures après transfection avec du DHG seul. Elles récupèrent ensuite dans un 1 ml de milieu complet pendant 20 heures pour après être rincées dans du milieu DHG + 0,1 % BSA + antibiotiques avant d'être stimulées à la rosiglitazone et au LPA dans ce milieu. Les données correspondent à l'activité luciférase "firefly" exprimée en RLU (moyenne des triplicats \pm écart type)



HeLa jour 1 après le repiquage
1 :3



HeLa jour 2 après le repiquage
1 :3



HeLa jour 3 après le repiquage
1 :3

Figure I.18: Micrographies en contraste de phase illustrant l'évolution au cours du temps d'une culture de cellules épithéliales HeLa repiquées 1:3 (grossissement X10).

nous fournit les inductions les plus marquées. La conditions B est clairement toxique pour les cellules (résultats non montrés).

Signalons que nous avons également testé un autre système de plasmide inducible: le pNFκB-Luc. Dans ce cas, les cellules ont été stimulées selon le protocole C, avec le TNFα (10 ng/ml). Nous avons également refait des expériences avec différents rapports ADN/Sf, confirmant que c'est toujours avec le rapport 1/3 que nous obtenons les meilleurs résultats (résultats non montrés).

III.1.4.4 Essais de transfection avec le plasmide pPPRE-Luc

Nous nous sommes enfin intéressés à un système inducible d'intérêt en relation avec PPARγ: le plasmide pPPRE-Luc.

Les cellules ont été stimulées à la rosiglitazone et au LPA. La rosiglitazone sert de contrôle positif, étant donné qu'il est prouvé depuis longtemps qu'elle est un ligand à haute affinité de PPARγ. Sa concentration finale est de 10 μM. Le LPA est également utilisé à une concentration finale de 10 μM, il s'agit dans son cas de prouver qu'il est bien un ligand de PPARγ supposé induire l'expression de la luciférase du plasmide pPPRE-Luc. Certaines cellules ne seront pas stimulées afin de servir de contrôle.

Les cellules ont été rincées 3 heures après transfection avec du DHG seul avant de recevoir 1 ml de milieu DHG + 10 % sérum + antibiotiques pour une durée de 20 heures. Elles sont alors stimulées 28 heures dans un milieu DHG + 0,1 % BSA + antibiotiques et l'activité est révélée 48 heures post-transfection. Cette fois-ci, nous avons testé une transfection simple, en espérant que la présence du plasmide inducible seul, permettrait d'obtenir des signaux "Firefly" plus élevés.

Les résultats obtenus sont illustrés à la **figure III.17**. Ils représentent l'activité luciférase "Firefly" en fonction des molécules stimulatrices. L'activité luciférase "Firefly" ne peut bien évidemment pas être normalisée. Dans ce cas, nous n'observons aucune induction, les valeurs des signaux luciférase "firefly" sont en fait de l'ordre de ceux du blanc. Aucune tendance n'a pu ressortir, pas même avec la rosiglitazone.

A l'heure actuelle, nous n'avons pas pu confirmer sur des cellules endothéliales que le LPA était bien un agoniste de PPARγ. L'une des raisons majeures de cet échec étant la difficulté de transfecter les cellules endothéliales, nous nous sommes tournés vers des cellules épithéliales, fréquemment utilisées comme modèle expérimental: les cellules HeLa, dérivées d'un carcinome du col de l'utérus.

III.2 Les cellules épithéliales Hela

III.2.1 Présentation du modèle cellulaire Hela

Nous avons donc décidé de changer de type cellulaire. Parmi les différents types cellulaires disponibles au laboratoire, nous avons choisi de travailler avec les cellules épithéliales HeLa. Tout comme les cellules endothéliales, les cellules épithéliales sont des cellules cohésives. Ce modèle cellulaire a aussi l'avantage tout comme les cellules EAhy926 d'être d'origine humaine. De plus, les Hela sont plus facilement transfectables et sont de fréquemment cités dans la littérature (Murph et al., 2003). Des travaux ont déjà prouvé l'existence des récepteurs au LPA dans ces cellules. Nous avons de nouveau dans un premier temps caractérisé ce modèle avant de passer également à la mise au point d'un système de transfection.

La **figure III.18** représente l'évolution au cours du temps de cellules repiquées selon une dilution 1:3. Dès le lendemain du repiquage, les cellules commencent à se toucher, pour finir

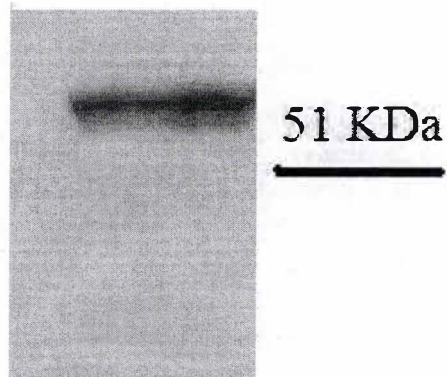


Figure III.19: Mise en évidence de la présence du récepteur membranaires LPA1 à partir d'extraits protéiques totaux obtenus sur des cellules épithéliales. L'anticorps primaire a été dilué 1: 13.000 dans la solution de blocking composée de TBS-T 0,1 % + 2 % du lait Amersham et incubé avec la membrane durant 2 heures à température ambiante sur rouleaux. La dilution de l'anticorps secondaire est de 1:250.000 dans la solution de blocking pour un temps d'incubation de 45 minutes sur rouleaux à température ambiante. Le temps d'exposition dans la cassette est de 3 minutes.

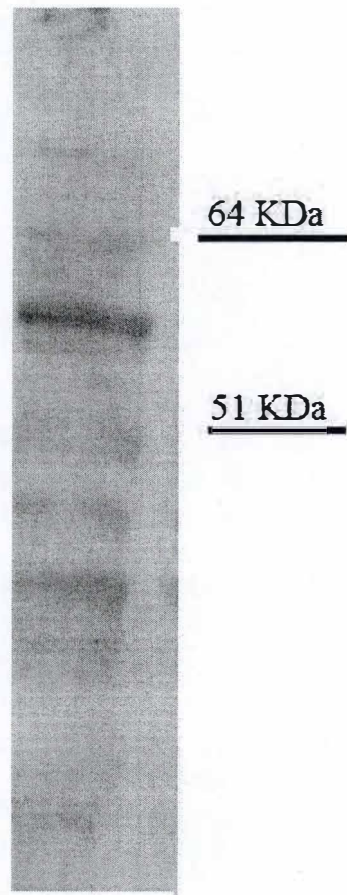


Figure III.20: Mise en évidence du récepteur membranaire LPA2 à partir d'extraits protéiques totaux obtenus sur des cellules épithéliales. L'anticorps primaire a été dilué 1:4.000 dans la solution de blocking contenant du TBS-T 0,1 % + 2 % de lait Amersham et incubé avec la membrane durant deux heures. La dilution de l'anticorps secondaire est de 1:250.000, pour un temps d'incubation de 45 minutes. Le temps de révélation est de 30 minutes.

	Conditions testées	
Solution de blocking	TBS + 0,1 % Tween + 2 % lait Amersham	
Volume pour le blocking	De 10 à 25 ml	
	Dilutions Anticorps primaire/secondaire	Temps d'exposition
LPA1	1:7.000 / 1:250.000 1:13.000 / 1:250.000	3 à 5 minutes
LPA2	1:3.000 / 1:250.000 1:4.000 / 1: 250.000	10 à 40 minutes
LPA3	1: 3.000 / 1:250.000 1:3.000 / 1:200.000 1:4.000 / 1:250.000 1:8.000 / 1:200.000 1:20.000/ 1:200.000	10 à 60 minutes
Volumes des lavages	10 à 25 ml	
Temps d'incubation avec les anticorps secondaires	45 minutes et une heure	
Divers	Agitation sur rouleaux pendant 5 minutes des tubes contenant la solution de blocking et l'Ac avant l'incubation avec les membranes Blocking: 2 heures ou toute la nuit Anticorps primaire: déposé deux heures ou toute la nuit	

Tableau III.5: Description des différents paramètres testés lors de la mise point du nouveau protocole de western blot visant à mettre en évidence la présence des récepteurs au LPA sur des cellules épithéliales. Les deux derniers point de la ligne "divers" ne concernent que le récepteur LPA3.

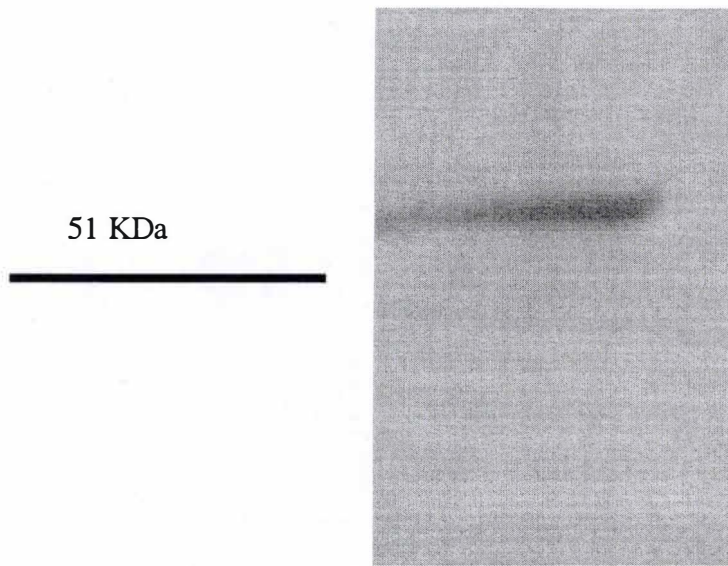


Figure III.21 : Analyse en Western Blot du facteur $\text{PPAR}\gamma$ à partir d'extraits totaux. L'anticorps primaire a été dilué 1 : 10.000 dans la solution de blocking contenant du TBS-T 0,1% + 2 % de lait Amersham et incubé en présence des membranes durant deux heures. L'anticorps secondaire a été dilué 1 : 250.000 dans la solution de blocking et incubé en présence des membranes durant 45 minutes. Le temps d'exposition dans la cassette est de 3 minutes.

par ne plus laisser d'espace intercellulaire après le troisième jour et commencer à se détacher. Rappelons qu'il s'agit de cellules cancéreuses.

III.2.2 Expression des récepteurs membranaires au LPA

Profitant des mises au point faites sur les cellules EAhy926, nous avons utilisé les mêmes conditions de western blot pour mettre en évidence la présence des récepteurs membranaires au LPA sur ce nouveau type cellulaire.

Nous avons donc pour le récepteur LPA1 procédé à une dilution 1:13.000 de l'anticorps primaire polyclonal de lapin et à une dilution 1:250.000 de l'anticorps secondaire suivant le nouveau protocole. Le temps d'exposition du film photosensible dans la cassette a également été de trois minutes. De nouveau, nous avons obtenu une bande bien marquée aux environs de 51-64 KDa avec un bruit de fond très faible (**figure III.19**).

Pour le récepteur LPA2, nous avons également utilisé le nouveau protocole, l'anticorps primaire étant dilué 1:4.000 et l'anticorps secondaire 1:250.000. Différents temps d'exposition ont été testés. À 30 minutes, nous obtenons une bande d'intensité plus faible que pour le récepteur LPA1 aux environs de 51-64 KDa. Les temps d'exposition plus longs ne font qu'augmenter le bruit de fond, peu visible à 30 minutes (**figure III.20**) (résultats non montrés).

Enfin le **tableau III.5** résume les différentes conditions et combinaisons testées notamment pour le récepteur LPA3. Pour ce récepteur LPA3, nous n'avons pu obtenir de bandes assez visibles ou des conditions dans lesquelles le bruit de fond n'était pas relativement élevé. Pour ce récepteur, il aurait été intéressant d'essayer l'ancien protocole avec les conditions utilisées pour les EAhy926. Il faut remarquer qu'un contrôle de charge sur l' α -tubuline a été effectué pour chaque récepteur en diluant 1:80.000 l'anticorps primaire anti- α -tubuline et 1:250.000 l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase. Pour chacun des Western Blot et chaque récepteur, une bande de même intensité est retrouvée à la bonne taille. En conclusion, les cellules HeLA exprime bien les récepteurs LPA1 et LPA2.

III.2.3 Expression de PPAR γ

Comme pour les cellules endothéliales, nous avons aussi vérifié que le modèle cellulaire exprimait le récepteur PPAR γ . Pour cela, nous avons testé le nouveau protocole et dilué l'anticorps primaire 1:10.000 et l'anticorps secondaire 1:250.000. Après 5 minutes d'exposition, une bande aux environs de 51 KDa est observée, de plus aucun bruit de fond n'est visible (**figure III.21**). Ce récepteur étant exprimé par ce modèle cellulaire nous pourrions donc vérifier si le LPA est bien un ligand de PPAR γ .

III.2.4 Mises au point des conditions de transfection

L'équipe Polyplex ayant commencé au laboratoire les mises au point de transfection sur les cellules Hela, nous nous sommes basés sur les premiers résultats obtenus afin de choisir nos conditions de travail. Par rapport aux cellules endothéliales, de nombreux paramètres changent. Ces cellules poussant plus vite, la veille de la transfection nous les repiquons à une densité de 40.000 cellules par puits dans une plaque à 12 puits. Ensuite les ratios ADN/ Sf 1/2 et 1/3 donnant des résultats similaires, nous avons décidé de travailler avec le ratio 1/2 afin d'utiliser moins de matériel. Le milieu de transfection sera composé de DHG seul, le sérum inhibant de manière drastique la transfection des cellules (résultats non montrés). De plus, la quantité d'ADN total par puits n'est plus de 1,5 μ g mais de 1 μ g.

Nous avons conservé la protocole de stimulation appelé "condition C" qui pour rappel, permettait aux cellules de récupérer pendant 20 heures dans un milieu complet avant d'être

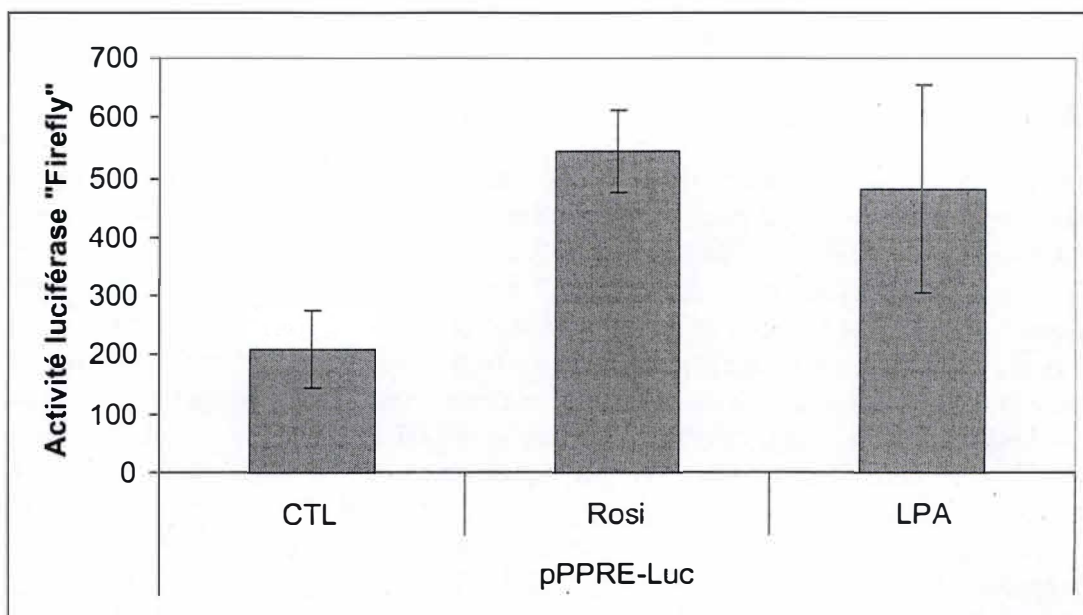


Figure III.22: Transfection simple de cellules HeLa avec le plasmide pPPRE-Luc. Les cellules sont repiquées la veille de façon à atteindre une densité de 40.000 cellules par puits. La quantité d'ADN total est de 1 μ g par puits, le ratio ADN/Sf est de 1:2 pour ce modèle. Le milieu de transfection est du DHG seul, les cellules sont également rincées une fois avec du DHG seul trois heures après la transfection avant de recevoir pendant 20 heures 1 ml de milieu complet. Elles sont ensuite stimulées durant 28 heures dans un milieu DHG + 0,1 % BSA + antibiotiques avec de la rosiglitazone 10 μ M ou du LPA 10 μ M. Ces résultats correspondent à l'activité luciférase "firefly" exprimée en RLU. (moyenne de triplicats \pm écart-type).

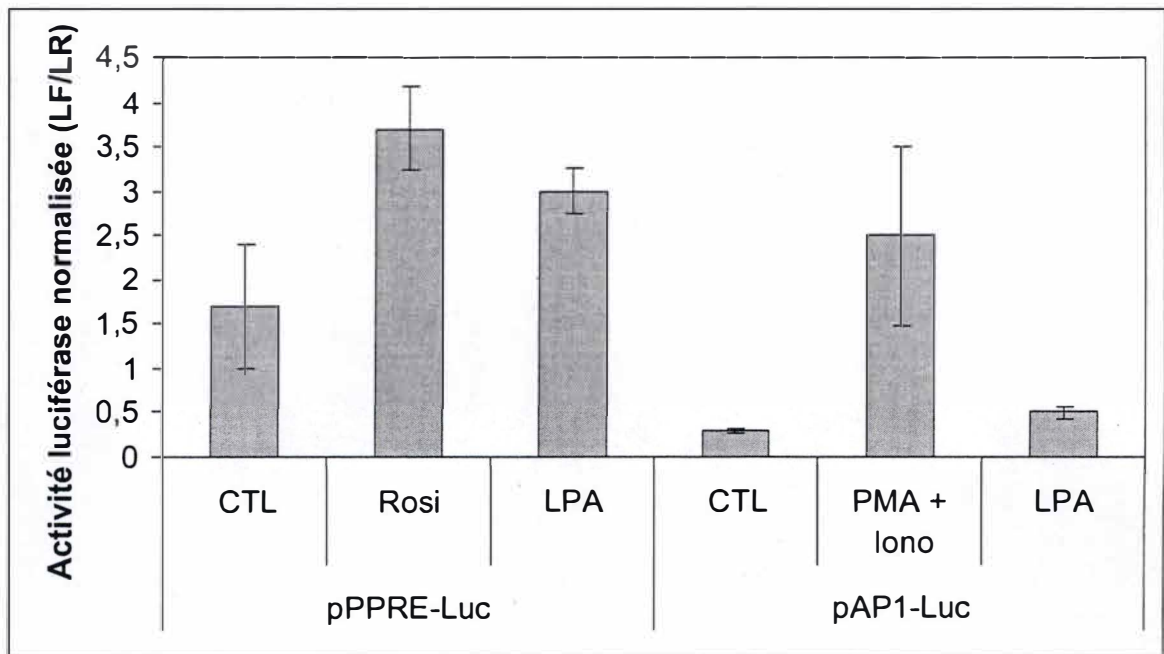


Figure III.23: Effet de la rosiglitazone, du LPA et du cocktail PMA/ionomycine sur l'activité luciférase firefly normalisée, après transfection des cellules HeLa avec le plasmide pPPRE-Luc ou pAP1-Luc. L'ordonnée représente l'activité luciférase normalisée (LF/LR) et l'abscisse les différentes conditions testées. Les plasmides inductibles sont présents dans un rapport 99/100 et le plasmide de référence pRL-SV40 dans un rapport 1/100. Les cellules ont été stimulées selon la condition C décrits à la figure III.15. Les données correspondent à la moyenne de triplicats \pm écart-type. Rosi= rosiglitazone 10 μ M, LPA: LPA 10 μ M, PMA + Iono= PMA 0,1 μ g/ml et ionomycine 1 mM.

stimulées 28 heures dans un milieu DHG + antibiotiques + BSA après un rincage au DHG seul (**figure III.15**).

III.2.4.1 Essais de transfection simple

Pour commencer, comme pour les EAhy926, nous avons vérifié que la présence du plasmide inductible seul permettait d'avoir une réponse aux différentes stimulations. Les cellules ont été transfectées avec le plasmide pPPRE-Luc et incubées en présence de rosiglitazone et de LPA à une concentration de 10 μ M. Les résultats présentés à la **figure III.22** illustrent l'activité luciférase "Firefly" en fonction des molécules utilisées pour activer pPPRE-Luc. Nous observons cette fois-ci une induction de 2,5 X par rapport au contrôle avec la rosiglitazone, avec des valeurs luciférase "Firefly" beaucoup plus élevées (544 RLU) que celles obtenues pour les EAhy926 (< 10 RLU). La stimulation au LPA induit une réponse de 2,3 X par rapport au contrôle. Ces données suggèrent que le LPA est bien un ligand de PPAR γ . Pour confirmer ces résultats, nous avons voulu tenter une double transfection afin de normaliser les valeurs "Firefly".

Nous avons donc testé le plasmide pPPRE-Luc et pAPI-Luc en double transfection avec deux rapports différents de plasmides (le plasmide de référence étant présent à un rapport soit de 1/50 ou soit de 1/100 et le plasmide inductible à respectivement 49/50 ou 99/100). Les cellules transfectées avec pPPRE-Luc ont été stimulées soit à la rosiglitazone à une concentration finale de 10 μ M, soit au LPA pour une même concentration finale. Enfin, les cellules transfectées avec le plasmide pAPI-Luc ont quant à elles été stimulées au PMA + Ionomycine à une concentration finale de 0,1 μ g/ml et 1mM ainsi qu'au LPA à une concentration finale de 10 μ M.

Les résultats présentés à la **figure III.23** proviennent de doubles transfusions faites pour des rapports 1/100 et 99/100, avec l'activité luciférase normalisée en fonction du type de plasmide et du type de stimulation. Nous observons de nouveau une induction du plasmide pPPRE-Luc et ce que ce soit pour les cellules stimulées à la rosiglitazone (2,6 X le contrôle) ou pour les cellules stimulées au LPA (1,6 X le contrôle). De plus, les valeurs brutes des signaux luciférase "Renilla" sont stables et élevés, ce qui devrait permettre de diminuer encore la proportion du plasmide de référence. Par contre, les cellules transfectées avec le plasmide pAPI-Luc ne répondent qu'à une stimulation au PMA + Ionomycine (10 X le contrôle). Contrairement aux cellules endothéliales, les cellules HeLa supporte parfaitement bien un traitement long en présence du cocktail PMA + ionomycine. Dans ce cas, le LPA ne semble pas activer AP-1.

Nous pouvons toutefois conclure que le LPA semble être un ligand de PPAR γ , il sera bien évidemment nécessaire de reproduire ces résultats et de continuer à optimiser les conditions de transfection en jouant sur les paramètres comme les proportions des plasmides ou encore le milieu de transfection.

IV. Conclusion et perspectives

L'athérosclérose est une pathologie cardiovasculaire qui est la première cause de décès dans les pays industrialisés et est en nette progression dans les pays en voie de développement. Elle est responsable de l'apparition de l'infarctus du myocarde et des attaques cérébrales, mais aussi d'autres atteintes comme l'ischémie myocardique chronique, la gangrène des membres inférieurs, l'infarctus mésentérique et l'encéphalopathie ischémique. L'athérosclérose se caractérise par un durcissement des parois et un rétrécissement anormal de la lumière des vaisseaux. L'initialisation et la progression de la pathologie semblent avoir une composante inflammatoire. Parmi les différentes hypothèses explicatives, il semble que les lipoprotéines oxydées contribuent d'une part à l'amplification de la réponse inflammatoire et d'autre part à la progression de la pathologie. L'oxydation des lipoprotéines a lieu par étapes successives commençant principalement dans l'intima. Siess et ses collègues (Siess et al., 1999) ont montré que les LDL moyennement oxydées (mox-LDL) étaient responsables, entre autres, de l'agrégation plaquettaire, de l'expression de molécules d'adhérence et donc de la diapédèse des monocytes. Ces effets sont attribués aux composants de ces mox-LDL et parmi ceux-ci on trouve le LPA. Le LPA augmente dans les lésions athérosclérotiques là où le risque de thrombose est le plus important. Le LPA est présent dans le sérum à une concentration comprise entre 1-5 μM et agit via des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. Nous nous sommes donc intéressés à ce phospholipide bioactif et particulièrement à ses effets sur les cellules endothéliales EAhy926 et épithéliales HeLa.

Enfin, très récemment, McIntyre et ses collègues (McIntyre et al., 2003) ont montré que le LPA pouvait également interagir via les récepteurs nucléaires, et en particulier le PPAR γ . Nous avons donc voulu déterminer si le LPA était bien un ligand de celui-ci dans les deux modèles de cellules étudiés, que nous allons passer en revue.

Les cellules endothéliales EAhy926

Expression des récepteurs membranaires au LPA

La première partie de ce mémoire est donc d'étudier les effets du LPA sur les voies d'activation sur les cellules endothéliales EAhy926 et donc de caractériser les récepteurs au LPA exprimés. Nous avons donc dans un premier temps montré que ces cellules exprimaient les trois récepteurs membranaires majeurs au LPA : le modèle de cellules EAhy926 étant relativement récent et encore peu caractérisé de ce point de vue, nous avons procédé à des mises au point des conditions expérimentales. Les récepteurs membranaires sont généralement difficiles à solubiliser, donc nous avons travaillé avec une quantité de protéines plus importante (40 μg) que dans le cas des protéines cytoplasmiques, pour augmenter les chances d'obtenir des bandes nettes. Il a fallu ensuite trouver quelles étaient les dilutions idéales des anticorps.

Dans un premier essai, les mêmes conditions ont été testées sur chaque récepteur. Nous avons obtenu à partir d'une dilution 1:5.000 de l'anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre les LPA2 et LPA3 et avec une dilution 1:100.000 de l'anticorps secondaire monoclonal de souris, une bande plus intense aux environs de 51-64 KDa. Ceci nous a d'abord surpris car le poids moléculaire attendu était respectivement de 39 et 40 KDa. Cependant peu de bruit de fond fut observé. Des résultats similaires furent obtenus pour LPA1 dans les mêmes conditions avec cependant un bruit de fond plus important (**figure III.2**). N'ayant pas obtenu la bande à la bonne taille, nous avons procédé à des recherches bibliographiques qui nous ont confirmé que la bande plus intense était bien celle attendue. Les récepteurs au LPA sont glycosylés, comme démontré par les travaux menés par Gobeil et son équipe (Gobeil et al.,

2003) qui en utilisant des inhibiteurs de la N-glycosylation ont pu retrouver la bande à la taille attendue. Sans inhibiteur, ils observent également les bandes aux environs de 51-64 KDa.

Diverses dilutions ont ensuite été testées sans succès. Il se fait qu'à ce moment au laboratoire, le protocole classique de western blot a été complètement revu, comme détaillé dans les résultats. L'avantage de ce nouveau protocole est qu'il permet de diminuer considérablement la quantité nécessaire d'anticorps, de diminuer les coûts et par la même occasion d'augmenter la spécificité de l'interaction antigène-anticorps. Nous avons alors obtenu pour le LPA1 suite à une dilution 1:13.000 de l'anticorps primaire et 1:250.000 de l'anticorps secondaire une seule bande sans bruit de fond apparent après seulement trois minutes de révélation (**figure III.4**). Les western blots réalisées pour les LPA2 et LPA3 n'ont pas donné de résultats meilleurs, malgré toutes les conditions testées décrites au **tableau III.1**. C'est pourquoi des dilutions 1:5.000 de l'anticorps primaire et 1:100.000 de l'anticorps secondaire selon l'ancien protocole ont été jugées préférables pour les LPA2 et LPA3. La qualité de l'anticorps primaire est sans doute critique à cet égard.

Expression du récepteur nucléaire PPAR γ

Pour continuer de caractériser le modèle cellulaire, nous avons voulu aussi montrer qu'il pouvait exprimer le récepteur nucléaire PPAR γ étant donné que la deuxième partie de ce mémoire consiste à savoir si le LPA est un ligand de ces récepteurs. Ce western Blot a déjà été réalisé par Cindy Gustin en diluant l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-PPAR γ 1:30.000 et l'anticorps secondaire 1:100.000 selon l'ancien protocole (**figure III.5**). Les cellules EAhy926 expriment donc bien le facteur PPAR γ .

Mises au point des conditions de transfection

Ayant vérifié que les récepteurs membranaires et nucléaires au LPA étaient exprimés sur le modèle cellulaire, nous avons pu passer à l'étude des voies de transduction du signal activées par le LPA à l'aide des systèmes rapporteurs. L'activation du facteur PPAR γ ne peut être suivie par la technique de retard sur gel ou par des tests colorimétriques de binding, car ce facteur est constitutivement lié à l'ADN. Pour cela nous avons travaillé avec des systèmes rapporteurs, nous permettant de quantifier de façon aisée l'expression d'un gène au sein d'un système inductible par le facteur PPAR γ activé, soit un plasmide pPPRE-Luciférase. L'objectif principal de ce mémoire sera de déterminer si le LPA est un ligand de PPAR γ . En effet, les données de la littérature à ce sujet restent très limitées : McIntyre et al (2003) ont décrit pour la première fois que le LPA était un ligand naturel à haute affinité pour le PPAR γ , alors que la plupart des autres lipides naturels ont une affinité beaucoup plus faible. McIntyre et son équipe avaient obtenu ces résultats sur une lignée de macrophages murins, les cellules RAW264.7. Les cellules endothéliales étant reconnues difficiles à transfecter nous avons dû faire de nombreuses mises au point. Bénéficiant de l'expérience passée de l'équipe, nous nous sommes intéressés en premier lieu au ratio ADN/Sf et le milieu de transfection. Le Sf a été choisi car des expériences préliminaires réalisées avant le mémoire, avaient montré que c'était l'un des agents transfectants les plus efficaces sur cette lignée.

Essais de transfection simple avec le plasmide pCMV- β

Nous avons mené les premiers essais de transfection simple avec le plasmide pCMV β et procédé à une révélation histochimique et colorimétrique. Parmi les trois ratios testés (1/1, 1/3, 1/5), le ratio 1/3 a offert tout comme le ratio 1/5 une efficacité de transfection

convenable. Pour choisir, quel ratio utiliser pour la suite, nous avons en parallèle mesuré la cytotoxicité pour chaque rapport, les résultats obtenus montrent que le rapport 1/3 dans un milieu de transfection avec 5 % sérum, donnent les meilleurs résultats avec une cytotoxicité acceptable (**figures III.6 et III.8**).

Essais de transfections triples avec la GFP comme système rapporteur

Une fois ces paramètres fixés, les résultats étant plutôt encourageants, nous avons tenté les transfections triples. Pour cela trois types de plasmides ont été utilisés : un plasmide inductible (pAPI-Luc ou pPPRE-Luc ou pNFκB-Luc), un plasmide de référence pRL-SV40 et un vecteur d'expression vide pCMV-Myc. Pour rappel, le plasmide de référence permet de normaliser l'activité luciférase « firefly » du plasmide inductible. Le vecteur vide est prévu pour des expériences à plus long terme, exploitant des dominants négatifs, outils particulièrement performants dans les études de transduction du signal.

Afin d'optimiser les proportions relatives de ces trois plasmides pour la transfection des cellules, nous avons remplacé le plasmide inductible par un plasmide dont l'expression est facilement quantifiable par nano-cytométrie de flux : le pEGFP-N1. Les différents rapports testés, décrits au **tableau III.3**, montrent un taux de transfection d'environ 15 %. Un test au MTT a permis également de montrer que la toxicité pour ces rapports était acceptable, aux environs de 30 % (**figure III.11**).

Essais de transfections triples avec la luciférase comme système rapporteur

La fluorescence est un moyen facile d'estimer un taux de transfection. Cependant tous les systèmes rapporteurs disponibles au laboratoire sont de type luciférase. C'est pourquoi nous avons d'abord vérifié que le système pouvait répondre à une stimulation par des acteurs des voies de transduction activés à l'aide d'un contrôle positif, le plasmide pFC-MEKK fourni par la firme Stratagene, sans passer par l'activation des cellules avec un agoniste. Ce plasmide code pour une MEK kinase sous contrôle d'un promoteur fort. Son rôle est d'activer les différents facteurs de transcription étudiés se trouvant en aval de la voie des MAP kinases, dans ce cas le facteur AP-1. Nous avons bien observé une expression de la luciférase inductible doublée par rapport aux cellules ayant reçu un plasmide d'expression vide. Ces résultats obtenus nous ont permis de vérifier la fonctionnalité du système inductible AP-1-dépendant (**figure III.13**).

L'étape suivante consistait à déterminer si le système rapporteur pouvait répondre à une stimulation de ces cellules après liaison d'un ligand à son récepteur. Pour cela, nous avons utilisé un système classique dont nous savons qu'il provoque l'activation du facteur de transcription d'intérêt. Le plasmide pAPI-Luc fut choisi avec pour stimulation le cocktail PMA + ionomycine à une concentration finale de 0,1 ng/μl et de 1mM. Mais, nous nous sommes heurtés à des problèmes imprévus de cytotoxicité du PMA + ionomycine et à des signaux luciférase "Firefly" très faibles et "Renilla" trop variables.

Essais de transfections double avec la luciférase comme système rapporteur

Nous avons alors décidé d'utiliser le VEGF comme molécule stimulatrice et de laisser provisoirement de côté le plasmide pCMV-Myc afin de pouvoir augmenter la proportion de plasmides inductibles. La proportion des plasmides inductibles est passée de 46,5/50 à 49/50. Pour résoudre les problèmes de faiblesse des signaux, trois nouveaux protocoles de stimulation ont été testés (**figure III.15**). De ceux-ci, un seul des protocole se dégage, mais avec des signaux "Firefly" toujours faibles (**figure III.16**).

Sur base de ce protocole nous avons enfin testé le plasmide pPPRE-Luc après incubation des cellules en présence de rosiglitazone et en présence de LPA, afin de savoir si celui-ci est bien un ligand du récepteur nucléaire PPAR γ . Pour chacune des molécules, la concentration finale est de 10 μ M. Les résultats obtenus (**figure III.17**) n'ont montré aucune induction, pas même pour le contrôle positif. Nous ne pouvons donc pas conclure si oui ou non le LPA est un ligand de PPAR γ pour les cellules EAhy926. L'une des raisons majeure est la difficulté de transfection de ce type de cellules. C'est pourquoi, nous avons choisi de travailler avec un modèle de cellules épithéliales humaines, les cellules HeLa issues d'un cancer du col de l'utérus.

Les cellules épithéliales HeLa

Expression des récepteurs membranaires au LPA

De nouveau, nous avons commencé par caractériser ce modèle et donc par montrer que les trois récepteurs membranaires ainsi que le récepteur nucléaire PPAR γ , étaient exprimés. Nous avons testé les mêmes conditions de western blot que sur les cellules EAhy926 pour mettre en évidence leur présence. Pour le récepteur LPA1, nous avons dilué l'anticorps primaire 1:13.000 et l'anticorps secondaire 1:250.000 selon le nouveau protocole et après 3 minutes seulement, nous observons une seule bande aux environs de 51-64 KDa sans bruit de fond apparent (**figure III.19**). En ce qui concerne le LPA2, une dilution 1:4.000 de l'anticorps primaire et 1:250.000 de l'anticorps secondaire permet de voir la bande avec un bruit de fond faible, pour un temps de révélation ne dépassant pas 30 minutes (**figure III.20**). Enfin aucune condition n'a permis d'obtenir un blot satisfaisant pour le LPA3.

Expression du récepteur nucléaire PPAR γ

Nous avons poursuivi la caractérisation dans le but de montrer que les cellules HeLa exprimaient le facteur PPAR γ . L'anticorps primaire a été dilué 1:10.000 dans la solution de blocking et l'anticorps secondaire 1:250.000 suivant le nouveau protocole. Après 3 minutes, une bande aux environs de 51 KDa était bien visible sans aucun bruit de fond (**figure III.21**).

Mises au point des conditions de transfection

Essais de transfection simple avec la luciférase comme système rapporteur

Ayant ainsi montré que ce modèle exprimait les récepteurs d'intérêt, nous sommes passés aux systèmes rapporteurs. Nous n'avons pas fait de mises au point, mais profité de l'expérience de l'équipe POLYPLEX. Les mêmes conditions que pour les EAhy926 furent testées, soit une transfection simple avec pPPRE-Luc, après incubation des cellules en présence de rosiglitazone et de LPA suivant la condition C (**figure III.15**). Cette fois ci, les cellules répondent aux stimulations par une induction de 2,5 X par rapport au contrôle avec la rosiglitazone et de 2,3 X par rapport au contrôle pour le LPA (**figure III.22**).

Essais de transfections doubles avec les luciférases comme systèmes rapporteurs

Suite à cela, nous sommes repassés aux transfections doubles pour normaliser l'activité luciférase "Firefly". Le plasmide pAPI-Luc et pPPRE-Luc furent de nouveau testés et les cellules stimulées respectivement soit avec le LPA ou la rosiglitazone, soit avec le cocktail PMA + ionomycine. Le plasmide pPPRE-Luc a répondu par une induction de 2,6 X par

rapport au contrôle en présence de rosiglitazone et de 1,6 X en présence de LPA. Ceci nous permet de conclure que le LPA semble bien être un ligand de PPAR γ comme McIntyre et ses collègues l'ont observé dans une lignée monocyttaire. Cependant, il est nécessaire de reproduire ces résultats et de continuer à optimiser les conditions de transfection.

Enfin, le plasmide pAP1-Luc a répondu à une stimulation au PMA + ionomycine par une induction de 10 X par rapport au contrôle, mais nous n'avons pas mis en évidence d'activation d'AP1 par le LPA.

En conclusion, les cellules endothéliales restent donc difficiles à transfecter. Parmi toutes les conditions testées, c'est probablement vers les systèmes rapporteurs basés sur les GFP qu'il faudra se tourner. En effet, en triple transfection, avec le plasmide pEGFP-N1, nous avons obtenu 15% d'efficacité de transfection. Malheureusement, il n'existe que peu de plasmides inductibles de type GFP. La firme BD Science commercialise déjà un plasmide pCRE-d2EGF qui répond à l'activation du facteur CREB. On pourrait donc envisager par manipulation génétique de construire différents plasmides inductibles de type GFP : pPPRE-d2EGF, pAP1-d2EGF, pSRE-d2EGF et pNF κ B-d2EGF, tous quatre intéressants pour décortiquer à l'échelle moléculaire la transduction du signal liée au LPA dans les cellules EAhy926.

Enfin, si nous n'avons pas pu montrer que le LPA était un ligand de PPAR γ pour les cellules endothéliales, nous l'avons confirmé pour les cellules HeLa. C'est donc une propriété supplémentaire du LPA dont il faudra tenir compte pour mieux comprendre les effets de ce lipide étonnant.

V. Bibliographie

- Altiock, S., M. Xu, et al. (1997). "PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A." Genes Dev **11**(15): 1987-98.
- Amri, E. Z., F. Bonino, et al. (1995). "Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors." J Biol Chem **270**(5): 2367-71.
- Anliker, B. and J. Chun (2004). "Lysophospholipid G protein-coupled receptors." J Biol Chem **279**(20): 20555-8.
- Aoki, J., A. Taira, et al. (2002). "Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways." J Biol Chem **277**(50): 48737-44.
- Baldwin, J. M. (1994). "Structure and function of receptors coupled to G proteins." Current Opinion in Cell Biology **6**: 180-190.
- Bandoh, K., J. Aoki, et al. (2000). "Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors." FEBS Lett **478**(1-2): 159-65.
- Barbier, O., I. P. Torra, et al. (2002). "Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(5): 717-26.
- Benditt, E. P. and J. M. Benditt (1973). "Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(6): 1753-6.
- Berger, J. and D. E. Moller (2002). "The mechanisms of action of PPARs." Annu Rev Med **53**: 409-35.
- Bishop, W. R. and R. M. Bell (1988). "Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation." Annu Rev Cell Biol **4**: 579-610.
- Blanquart, C., O. Barbier, et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation." J Steroid Biochem Mol Biol **85**(2-5): 267-73.
- Blumer, K. J. and G. L. Johnson (1994). "Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways." Trends Biochem Sci **19**(6): 236-40.
- Capeau, J. (2003). "[Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]." Med Sci (Paris) **19**(8-9): 834-9.
- Chinetti, G., J. C. Fruchart, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation." Inflamm Res **49**(10): 497-505.
- Contos, J. J., I. Ishii, et al. (2000). "Lysophosphatidic acid receptors." Mol Pharmacol **58**(6): 1188-96.
- Cushing, S. D., J. A. Berliner, et al. (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 5134-8.
- DeFronzo, R. A. (1988). "Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM." Diabetes **37**(6): 667-87.
- Delerive, P., F. Martin-Nizard, et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway." Circ Res **85**(5): 394-402.

- Eder, A. M., T. Sasagawa, et al. (2000). "Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)-induced LPA production: role of phospholipase D and phospholipase A2." Clin Cancer Res 6(6): 2482-91.
- Edgell, C. J., C. C. McDonald, et al. (1983). "Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization." Proc Natl Acad Sci U S A 80(12): 3734-7.
- Escher, P. and W. Wahli (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions." Mutat Res 448(2): 121-38.
- Faggiotto, A. and R. Ross (1984). "Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque." Arteriosclerosis 4(4): 341-56.
- Farrens, D. L., C. Altenbach, et al. (1996). "Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin." Science 274(5288): 768-70.
- Febbraio, M., E. A. Podrez, et al. (2000). "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice." J Clin Invest 105(8): 1049-56.
- Foucarde, O., M. F. Simon, et al. (1995). Med. Sci. 12: 323-332.
- Furlong, C. E., R. J. Richter, et al. (1991). "Purification of rabbit and human serum paraoxonase." Biochemistry 30(42): 10133-40.
- Gaits, F., O. Fourcade, et al. (1997). "Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis." FEBS Lett 410(1): 54-8.
- Gerrard, J. M. and P. Robinson (1989). "Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin." Biochim Biophys Acta 1001(3): 282-5.
- Goetzl, E. J. and S. An (1998). "Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate." Faseb J 12(15): 1589-98.
- Goetzl, E. J., Y. Kong, et al. (1999). "Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of Bax." J Immunol 162(4): 2049-56.
- Goldstein, J. L., Y. K. Ho, et al. (1979). "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition." Proc Natl Acad Sci U S A 76(1): 333-7.
- Gurnell, M. (2003). "PPARgamma and metabolism: insights from the study of human genetic variants." Clin Endocrinol (Oxf) 59(3): 267-77.
- Haberland, M. E., D. Fong, et al. (1988). "Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits." Science 241(4862): 215-8.
- Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." J Biol Chem 273(2): 669-72.
- Han, J., D. P. Hajjar, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." J Biol Chem 275(2): 1241-6.
- Hla, T. and T. Maciag (1990). "An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors." J Biol Chem 265(16): 9308-13.
- Horkko, S., C. J. Binder, et al. (2000). "Immunological responses to oxidized LDL." Free Radic Biol Med 28(12): 1771-9.
- Houseknecht, K. L., B. M. Cole, et al. (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review." Domest Anim Endocrinol 22(1): 1-23.
- Hurt-Camejo, E., G. Camejo, et al. (2001). "Phospholipase A(2) in vascular disease." Circ Res 89(4): 298-304.

- Issemann, I. and S. Green (1990). "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators." Nature **347**(6294): 645-50.
- Jalink, K., P. L. Hordijk, et al. (1994). "Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator." Biochim Biophys Acta **1198**(2-3): 185-96.
- Jalink, K., E. J. van Corven, et al. (1990). "Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca²⁺(+)-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action." J Biol Chem **265**(21): 12232-9.
- Jasinska, R., Q. X. Zhang, et al. (1999). "Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters." Biochem J **340** (Pt 3): 677-86.
- Kalman, S., W. Mitchell, et al. (1999). "Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*." Nat Genet **21**(4): 385-9.
- Kersten, S., B. Desvergne, et al. (2000). "Roles of PPARs in health and disease." Nature **405**(6785): 421-4.
- Kimura, K., M. Ito, et al. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-8.
- Kranenburg, O. and W. H. Moolenaar (2001). "Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists." Oncogene **20**(13): 1540-6.
- Lehmann, J. M., J. M. Lenhard, et al. (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs." J Biol Chem **272**(6): 3406-10.
- Lehmann, J. M., L. B. Moore, et al. (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)." J Biol Chem **270**(22): 12953-6.
- Lehrke, M. and M. A. Lazar (2004). "Inflamed about obesity." Nat Med **10**(2): 126-7.
- Lemberger, T., B. Desvergne, et al. (1996). "Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 335-63.
- McIntyre, T. M., A. V. Pontsler, et al. (2003). "Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 131-6.
- Mital, A., K. Rakesh, et al. (2002). "PPARs: Nuclear receptors for antidiabetics." CRIPS **3**(1): 5-8.
- Moolenaar, W. H. (1994). "LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions." Trends Cell Biol **4**(6): 213-9.
- Moolenaar, W. H. (1995). "Lysophosphatidic acid signalling." Curr Opin Cell Biol **7**(2): 203-10.
- Moolenaar, W. H. (1995). "Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger." J Biol Chem **270**(22): 12949-52.
- Moolenaar, W. H., O. Kranenburg, et al. (1997). "Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 168-73.
- Moolenaar, W. H., W. Kruijer, et al. (1986). "Growth factor-like action of phosphatidic acid." Nature **323**(6084): 171-3.
- Murph, M. M., L. A. Scaccia, et al. (2003). "Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway." J Cell Sci **116**(Pt 10): 1969-80.
- Neve, B. P., J. C. Fruchart, et al. (2000). "Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis." Biochem Pharmacol **60**(8): 1245-50.

- Nishizawa, H., K. Yamagata, et al. (2002). "Small heterodimer partner, an orphan nuclear receptor, augments peroxisome proliferator-activated receptor gamma transactivation." J Biol Chem **277**(2): 1586-92.
- Noel, J. P., H. E. Hamm, et al. (1993). "The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP gamma S." Nature **366**(6456): 654-63.
- Palinski, W., M. E. Rosenfeld, et al. (1989). "Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1372-6.
- Parhami, F., Z. T. Fang, et al. (1995). "Stimulation of Gs and inhibition of Gi protein functions by minimally oxidized LDL." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(11): 2019-24.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.
- Pilquill, C., I. Singh, et al. (2001). "Lipid phosphate phosphatase-1 dephosphorylates exogenous lysophosphatidate and thereby attenuates its effects on cell signalling." Prostaglandins Other Lipid Mediat **64**(1-4): 83-92.
- Puigserver, P., G. Adelmant, et al. (1999). "Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking." Science **286**(5443): 1368-71.
- Rameh, L. E. and L. C. Cantley (1999). "The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function." J Biol Chem **274**(13): 8347-50.
- Reithmann, C., P. Gierschik, et al. (1990). "Stimulation and inhibition of adenylyl cyclase." Symp Soc Exp Biol **44**: 207-24.
- Renard, P., I. Ernest, et al. (2001). "Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB." Nucleic Acids Res **29**(4): E21.
- Robbins, D. J., E. Zhen, et al. (1993). "Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro." J Biol Chem **268**(7): 5097-106.
- Roberts, R., V. A. Sciorra, et al. (1998). "Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform." J Biol Chem **273**(34): 22059-67.
- Ross, E. M. and T. M. Wilkie (2000). "GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins." Annu Rev Biochem **69**: 795-827.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-9.
- Ross, R. and J. A. Glomset (1976). "The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)." N Engl J Med **295**(7): 369-77.
- Schumacher, K. A., H. G. Classen, et al. (1979). "Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS)." Thromb Haemost **42**(2): 631-40.
- Sekas, G., G. M. Patton, et al. (1985). "Origin of plasma lysophosphatidylcholine: evidence for direct hepatic secretion in the rat." J Lab Clin Med **105**(2): 190-4.
- Shao, D., S. M. Rangwala, et al. (1998). "Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma." Nature **396**(6709): 377-80.
- Siess, W. (2002). "Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate." Biochim Biophys Acta **1582**(1-3): 204-15.
- Siess, W., K. J. Zangl, et al. (1999). "Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6931-6.
- Six, D. A. and E. A. Dennis (2000). "The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization." Biochim Biophys Acta **1488**(1-2): 1-19.

- Sondek, J., A. Bohm, et al. (1996). "Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution." *Nature* **379**(6563): 369-74.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, et al. (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." *N Engl J Med* **320**(14): 915-24.
- Sternweis, P. C. (1994). "The active role of beta gamma in signal transduction." *Current Opinion in Cell Biology* **6**: 198-203.
- Stevens and Lowe (1997). *Anatomie pathologie générale et spéciale*.
- Takano, H. and I. Komuro (2002). "Roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in cardiovascular disease." *J Diabetes Complications* **16**(1): 108-14.
- Tedgui, A. and Z. Mallat (2001). "Athérosclérose et inflammation." *médecine/sciences* **17**: 162-169.
- Tigyi, G., K. Liliom, et al. (1998). "Phospholipid growth factors: Identification and mechanism of action. In lipid second messengers."
- Tigyi, G. and R. Miledi (1992). "Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells." *J Biol Chem* **267**(30): 21360-7.
- Tokumura, A. (2002). "Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids." *Biochim Biophys Acta* **1582**(1-3): 18-25.
- Tontonoz, P., E. Hu, et al. (1995). "PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene." *Mol Cell Biol* **15**(1): 351-7.
- Tontonoz, P., L. Nagy, et al. (1998). "PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL." *Cell* **93**(2): 241-52.
- Tontonoz, P., S. Singer, et al. (1997). "Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1): 237-41.
- van Corven, E. J., P. L. Hordijk, et al. (1993). "Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4): 1257-61.
- van der Bend, R. L., J. de Widt, et al. (1992). "The biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, induces phosphatidylcholine breakdown in fibroblasts via activation of phospholipase D. Comparison with the response to endothelin." *Biochem J* **285** (Pt 1): 235-40.
- Vidal, H. (2002). "Généralités sur les PPARs, distribution tissulaire, régulation de l'expression, mutations."
- Wakino, S., R. E. Law, et al. (2002). "Vascular protective effects by activation of nuclear receptor PPARgamma." *J Diabetes Complications* **16**(1): 46-9.
- Weiner, J. A. and J. Chun (1999). "Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5233-8.
- Witztum, J. L. and D. Steinberg (1991). "Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis." *J Clin Invest* **88**(6): 1785-92.
- Xie, Y., T. C. Gibbs, et al. (2002). "Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator." *Biochim Biophys Acta* **1582**(1-3): 270-81.
- Xu, Y., Z. Shen, et al. (1998). "Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers." *Jama* **280**(8): 719-23.
- Yakubu, M. A., K. Liliom, et al. (1997). "Role of lysophosphatidic acid in endothelin-1- and hematoma-induced alteration of cerebral microcirculation." *Am J Physiol* **273**(2 Pt 2): R703-9.
- Yart, A., H. Chap, et al. (2002). "Phosphoinositide 3-kinases in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway." *Biochim Biophys Acta* **1582**(1-3): 107-11.

- Ye, X., I. Ishii, et al. (2002). "Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor." *Biochim Biophys Acta* **1585**(2-3): 108-13.
- Yokoyama, K., I. Kudo, et al. (1995). "Phospholipid degradation in rat calcium ionophore-activated platelets is catalyzed mainly by two discrete secretory phospholipase As." *J Biochem (Tokyo)* **117**(6): 1280-7.
- Yu, K., W. Bayona, et al. (1995). "Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids." *J Biol Chem* **270**(41): 23975-83.
- Zhang, C., D. L. Baker, et al. (2004). "Lysophosphatidic Acid Induces Neointima Formation Through PPAR{gamma} Activation." *J Exp Med* **199**(6): 763-774.
- Barter, P., Baker, P., Gamble, J., Vadas, M. and Rye, K.-A. (2002) Anti-inflammatory Properties of High Density Lipoproteins. In Fruchart, J.-C., Gotto, A.M.J., Paoletti, R., Staels, B. and Catapano, A.L. (eds.), *Peroxisome Proliferator Activated Receptors: From Basic Science to Clinical Applications*. kluwer Academic Publishers, Milan, London, Vol. 18, pp. 95-101.
- Chawla, A., Lee, C.-H., Barak, Y., Liao, D. and evans, R.M. (2002) Functions of PPAR Gamma in Macrophages and Atherosclerosis. In Fruchart, J.-C., Gotto, A.M.J., Paoletti, R., Staels, B. and Catapano, A.L. (eds.), *Peroxisome Proliferator Activated Receptors: From Basic Science to Clinical Applications*. kluwer Academic Publishers, Milan, London, Vol. 18, pp. 9-16.
- Marx, N. (2002) PPARs and atherogenesis: Mediators or modulators of the inflammatory response in the vessel wall. **18**, 17-24.
- Pilon, A., Duez, H., Fruchart, J.C. and Staels, B. (2002) Role of PPARs in Inflammation, Atherosclerosis, and Thrombosis. In Fruchart, J.-C., Gotto, A.M.J., Paoletti, R., Staels, B. and Catapano, A.L. (eds.), *Peroxisome Proliferator Activated Receptors: From Basic Science to Clinical Applications*. kluwer Academic Publishers, Milan, London, Vol. 18, pp. 25-34.

16 JUN 2004

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20